VOLUMEN 12 ENERO-MARZO 1959 NUMERO 1

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

RAM
28 MAR 1960

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

SUMARIO

Páginas

Estudios sobre metabolismo enzimático del *Streptomyces griseus*. I. Actividad α-glucosidasa, por *Ramón Otero Abalo* y *Benito Regueiro Varela* 1

Determinación de anticuerpos fijadores del complemento en sueros de conejos inmunizados con virus antivariólico (Conclusión), por *María del Rosario de Zuazo Aguirre* 25

Un nuevo *Streptomyces* con propiedades antibacterianas y antifúngicas, por *Rafael Jordá, Miguel López* y *Benito Regueiro*. 55

Estudios sobre producción de ácido cítrico por fermentación. II. Influencia de los iones metálicos en la fermentación en superficie, por *José Luis Malo Echevarría* y *Benito Regueiro Varela*. 65

Actas de la Sociedad 85

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE METABOLISMO ENZIMATICO DEL *STREPTOMYCES GRISEUS*

I. Actividad α-glucosidasa.

POR
RAMÓN OTERO ABALO y BENITO REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

El metabolismo en general de los Actinomicetales, y en particular de los *Streptomyces,* ha sido objeto de numerosos trabajos, aunque, debido a su complejidad, estos trabajos se han orientado a determinadas partes o reacciones metabólicas. Nosotros orientamos nuestro trabajo al metabolismo de los enzimas.

Alimentación de los Streptomyces.

Los *Streptomyces,* como todos los microorganismos, toman los alimentos del medio exterior y los transforman, quedando unos en el interior y secretando otros en el medio. Para su alimentación necesitan una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y otros elementos. En relación con nuestro trabajo, nos interesa que el medio produzca condiciones necesarias para el crecimiento del microorganismo y condiciones para la producción de un antibiótico, para poder establecer relaciones de metabolismo.

A partir del medio de cultivo dado por Waksman (1945) para la producción de estreptomicina por el *Streptomyces griseus,* se han propuesto otros muchos de tipo natural o tipo sintético, según los ingredientes del medio, siendo de más interés para nosotros los del segundo tipo,

como los de G. C. Ainsworth y otros (1947), Thornberry y Anderson (1948), O'Brien, Wagman, Perlman (1952).

Elementos traza en nutrición de Streptomyces.

Observando los medios sintéticos, aparte las fuentes de carbono y nitrógeno, necesarias en la nutrición de todos los microorganismos, los *Streptomyces* necesitan un suministro de elementos metálicos en pequeña cantidad; es decir, de elementos traza.

Lepage & Campbell (1946), Thornberry (1946), Woodruff (1947), ya habían observado la necesidad de hierro, zinc y magnesio en la producción de estreptomicina por el *Streptomyces griseus*. Chesters & Rolinson (1950), notan que para el crecimiento del *Streptomices griseus* se necesitan 0,5 ppm. de zinc, 0,2 ppm. de hierro y 0,05 ppm. de cobre. La producción de estreptomicina es igual en todos los casos, a no ser el zinc que la aumenta algo; 50 ppm. de estos metales rebajan un 50 % la producción de antibiótico. Más adelante, los mismos autores Chesters & Rolinson (1951), ven que el zinc y el cobre son necesarios en crecimiento y en producción de antibiótico y que se necesita cinco veces menos hierro para crecimiento que para producción.

En general, de la observación de todos los trabajos sobre relación entre elementos traza, crecimiento y producción de estreptomicina por el *Streptomyces griseus* se observan numerosas contradicciones experimentales; esto puede deberse al empleo de diferentes razas de micro organismos, en cuanto a sus necesidades nutritivas minerales.

Metabolismo del Streptomyces griseus.

Todos los elementos nutritivos que integran el medio tienen o cumplen una función en el metabolismo del microorganismo. Por ejemplo: Dulaney & Perlman (1947), Dulaney & Hodges & Perlman (1947), y Dulaney (1949), estudiaron la relación entre el suministro de varios azúcares y la producción de estreptomicina. Hockenhull y colaboradores (1954), estudiaron el metabolismo de la glucosa por el *Streptomyces griseus*. En resumen, el metabolismo de azúcares por los *Streptomyces* fue bastante estudiado. Lo mismo ocurre con el metabolismo nitrogenado y el de los metales, en relación con la producción de estreptomicina

Realizando una revisión sobre la nutrición de microorganismos, J. L. Stokes (1952), se fija en la relación entre la nutrición y la formación de enzimas. Esta última se relaciona con el suministro de iones metálicos, factores de crecimiento y aminoácidos, durante la fase de crecimiento. Una alteración del metabolismo celular afecta específicamente la formación de determinados enzimas.

Enzimas de microorganismos.

En los microorganismos, como en todos los organismos vivos, los procesos metabólicos se asocian a la actividad de los enzimas; en el caso especial del *Streptomyces griseus* la formación de estreptomicina estará afectada por el metabolismo de determinados enzimas. Estos enzimas se afectan a su vez por determinados factores, entre los que podemos señalar: la relación enzima/sustrato, el pH, los iones metálicos, etc.

Los enzimas que forman los microorganismos pueden ser: exocelulares, si se encuentran en el medio de crecimiento, y que son catalizadores de reacciones hidrolíticas, y endocelulares, que se encuentran dentro de la célula y que toman parte en reacciones energéticas. En general, cada especie de microorganismo posee un sistema enzimático característico, que puede variar por diversas influencias, sobre todo por la composición del medio. Según éste, los enzimas pueden ser: constitutivos, si el medio o sustrato no influye en su formación, y adaptativos, si su formación depende de la presencia de un sustrato específico. La constitución "actual" enzimática de un microorganismo es una parte de su constitución "potencial", la cual se selecciona según las condiciones de crecimiento. Los microorganismos están expuestos a la influencia del medio externo, respondiendo a variaciones de éste, con la formación de enzimas adaptativos; esta respuesta se caracteriza por una reorganización de la economía interna del microorganismo, por lo cual, la formación de productos de metabolismo es diferente en cada caso. En resumen, la constitución del medio afecta a la formación de enzimas por los microorganismos. El tipo de enzimas afecta a su vez a la formación de productos de metabolismo; luego, variaciones en la constitución del medio afectan a la producción final de sustancias de metabolismo. Precisamente este es uno de los objetivos que persigue este trabajo.

En la parte experimental que se relaciona con los enzimas, se trata de estudiar la forma de obtener dichos enzimas. Cuando se trata de los de tipo exocelular, la cuestión es sencilla, pues basta centrifugar el medio de cultivo para obtener un filtrado con actividad enzimática posible. Cuando se trata de estudiar los enzimas endocelulares, la dificultad es grande y es difícil señalar técnicas generales de obtención.

Hugo (1954) realiza una revisión de este problema y lo mismo Colowick & Kaplan (1955). Señalan que la elección de un método para obtener un enzima intracelular depende de: raza microorganismo, facilidad de ruptura de la célula, localización del enzima, etc. Y la posibilidad de la futura determinación depende mucho del tratamiento previo a que se sometió el microorganismo.

De los diferentes tipos de tratamiento, el más empleado es el de desecación, del cual existen varios sistemas, con sus ventajas y desventajas (por aire, por vacio, liofilización y deshidratación por disolventes miscibles en agua); de todos, el último es el más sencillo y también el más eficaz en nuestro caso.

El método consiste en añadir a una suspensión de gérmenes diez volúmenes de acetona fría; los gérmenes se sedimentan y lavan con acetona y éter; se evapora éste y queda un polvo seco de microorganismos con sus enzimas, que muestran actividad cuando se añade agua. Este método lo emplearon numerosos autores, como Bernheim (1928), Gale (1946), Plaut & Lardy (1949), Hochester & Quastel (1951), Gray (1952), Wood & Gunsalus & Umbreit (1947).

Enzimas relacionados con metabolismo estreptomicina.

Hemos visto en todo lo anterior la relación entre alimentos, enzimas y producción de estreptomicina.

Sabemos que existen cientos de enzimas diferentes y específicos dentro de cada célula; como resulta imposible el estudio de todos ellos, nos orientaremos hacia los que parecen tienen una mayor relación con la formación de estreptomicina. Son estos: α — glucosidasa, α — manosidasa, fosfatasas, lipasas, proteinasas.

El contenido de estos enzimas varía durante el crecimiento del microorganismo, *Streptomyces griseus,* correspondiendo un determinado nivel a cada fase de desarrollo, pudiendo así construir curvas de enzimas,

que pueden relacionarse con las curvas de otros productos de metabolismo. Variaciones en el suministro de alimentos pueden hacer variar las curvas anteriores, entre las que se debe buscar correlaciones.

α- glucosidasas de microorganismos.

Muchos materiales de origen biológico poseen enzimas capaces de hidrolizar glucósidos de origen natural. Siendo la estreptomicina un α-glucósido, interesa estudiar el enzima específico de estas sustancias. Este tipo de enzima fue poco estudiado en los microorganismos, por lo que pocas o ninguna referencia bibliográfica podemos hacer sobre ellos.

Para su estudio se utiliza como sustrato el α-fenil-D-glucósido, observando la hidrolisis por determinación del fenol libre, como se indica en la parte de métodos.

Nosotros estudiamos la actividad en α-glucosidasa del *Streptomyces griseus,* tanto exocelular como intracelular. Estudiamos, a su vez, la influencia de algunos factores (relación enzima/sustrato, pH, magnesio, hierro, zinc, manganeso) en este enzima. Por último observamos la influencia de los componentes del medio en la actividad α-glucosidasa exocelular e intracelular. Con esto se establecen algunas conclusiones de interés para un mejor conocimiento del metabolismo del *Streptomyces griseus.*

METODOS Y TECNICAS.

El microorganismo empleado en todas las experiencias es un *Streptomyces griseus,* enviado desde Madrid por la Dirección de nuestro Instituto. Se conserva en tubos de tierra, preparados según la técnica de Backus (comunicación personal). Las esporas se producen sembrando un medio de esporulación (glucosa, 1,00 % + extracto levadura, 2,00 % + sulfato magnesio, 0,05 % + fosfato dipotásico, 0,05 % + agar, 2,50 % a pH: 7.0), buena esporulación se produce a los siete días a 25°.

Las fermentaciones se realizan en matraces Erlemmeyer, bien limpios, de 1.000 c. c., a los que se añaden 100 c. c. de medio de fermentación. Cada matraz se siembra con un c. c. de suspensión de esporas en agua destilada, que da una turbidez de 70 (fotocolorímetro Kipp, filtro 55).

La fermentación se realiza en agitación en un agitador de tipo vaivén, que da 90 oscilaciones por minuto, con un recorrido de 10 cm. y controlado a 30°. Una fotografía del agitador muestra la disposición de los matraces (Fig. 1).

Como medio de fermentación utilizamos dos: uno de ellos, que llamamos *natural*, se compone de: harina de soja, 4,00 % + corn-

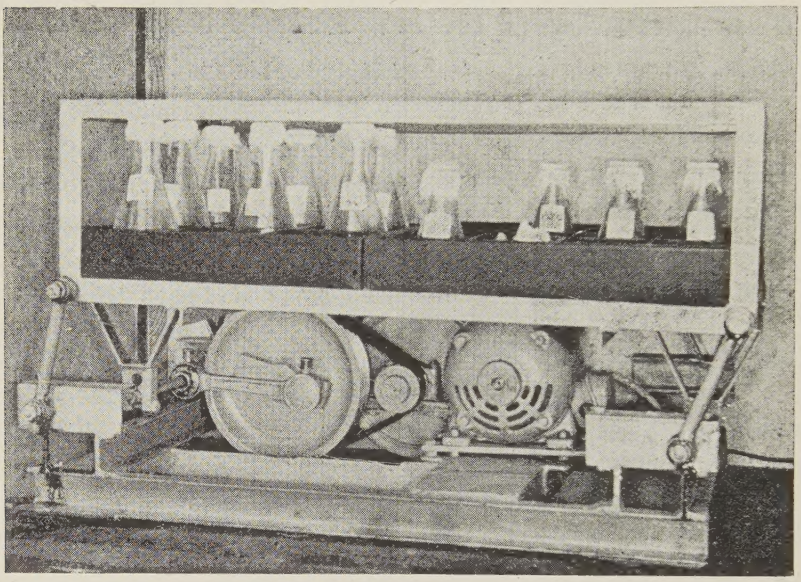


FIGURA 1.

steep, 1,00 % + glucosa, 4,00 % + cloruro sódico, 0,25 %, ajustado a pH, 7,00; el otro medio es de tipo *sintético*, y se compone de: corn-steep. 0,10 % + sulfato amónico, 1,00 % + nitrato sódico, 0,20 % + glucosa, 4,00 % + cloruro sódico, 0,30 % + fosfato dipotásico, 0,10 % + carbonato cálcico, 1,00 % y pequeñas cantidades de sales de magnesio, zinc, hierro y manganeso a pH, 7.5.

A intervalos de tiempo de fermentación se toman muestras asépticamente a fin de efectuar determinaciones de pH, volumen de micelio, azúcar remanente, estreptomicina, manosido - estreptomicina, actividad α-glucosidasa (en micelio y en filtrado).

Cuando se sigue la marcha de una fermentación, las cifras que se dan representan el promedio de 20 matraces; cuando las determinaciones se realizan al final de la fermentación el promedio es de tres matraces.

Las determinaciones de pH se realizan en un pH-metro Beckman, modelo G, por lectura directa.

La determinación de volumen de micelio se hace por centrifugación de una muestra de caldo de fermentación a 2.500 r. p. m., durante diez minutos, observando el nivel alcanzado por el micelio de 10 c. c. de caldo en un tubo graduado.

El azúcar remanente se determina por el método de Shaffer & Somogyi (1933) para glucosa, para lo cual previamente se construye una curva standard. Para las determinaciones de estreptomicina y manosido-estreptomicina (estreptomicina B), seguimos los métodos químicos dados por Grove & Randall (1955). Estos métodos se fundan en la adsorción de la estreptomicina por una resina cambiadora de iones (empleamos "Amberlita" I R C — 50), elución de la misma y determinación colorimétrica. Esta determinación se funda en la producción de maltol cuando se calienta la estreptomicina con un álcali y luego añade nitrato férrico que desarrolla un color violeta que se observa en colorímetro (aparato Kipp, filtro 53). La determinación de manosido-estreptomicina se funda en el desarrollo de color de la misma con antrona, que se observa en colorímetro (aparato Kipp, filtro 66).

Para la determinación de la α-glucosidasa se utilizan micelios y filtrados de caldos de fermentación. Se centrifugan muestras de caldo y el líquido se separa y utiliza directamente. El micelio se lava varias veces y deseca después por adición de acetona fría dos veces, éter frío y evaporación en desecador de vacío. El polvo que se obtiene se utiliza como fuente de enzima intracelular.

Para la determinación de actividad α-glucosidasa se utiliza la técnica modificada que dan Hockenhull y colaboradores (1954) para la manosidasa. Este método se funda en la determinación de fenol liberado por el enzima por el método de Gottlieb & Marsch (1946), fundado en el desarrollo de color del fenol con la 4-aminoantipirina.

Utilizamos como sustrato el α-fenil-D-glucosido, preparado por el Dr. I. Ribas, en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de Santiago, a quien expresamos nuestro agradecimiento.

Como enzima utilizamos 100 mgr. de micelio desecado ó 5 c. c. de filtrado de caldo. Se le añade fosfato buffer a pH 7.6 y un c. c. de α-fenil-glucosido, y se coloca todo en unos matraces especiales, que se indican en la figura 2. Se pone en agitación a vaivén. A las cinco horas se retiran los matraces, añade etanol de 96°, filtra y determina el fenol liberado en una muestra de un c. c. Para esto se añaden: buffer de glicocola, solución de ferricianuro potásico y solución de aminoantipirina;

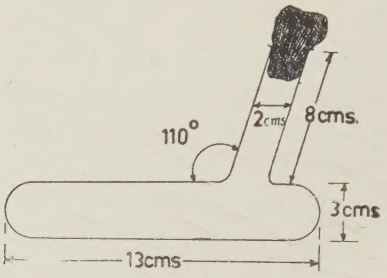


FIGURA 2.

se produce color debido al fenol liberado, que se mide colorimétricamente (colorímetro Kipp, filtro 55), comparando después con una curva standard de fenol.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

Las experiencias realizadas en este trabajo pueden resumirse en los cuatro apartados siguientes: *a)* Metabolismo del *Streptomyces griseus* en medio natural y sintético; *b),* actividad α-glucosidasa exocelular e intracelular del *Streptomyces griseus; c),* influencia de algunos factores en la actividad α-glucosidasa; *d),* influencia de algunos componentes del medio sintético en la actiivdad α-glucosidasa.

a) *Metabolismo del* Streptomyces griseus *en medio natural y sintético.*

Por los métodos anteriormente señalados se realizan dos fermentaciones, una en medio natural y otra en medio sintético. Los resultados en el medio natural son los siguientes:

Horas	pH	Micelio	Azúcar	Estreptomicina	Manosido — estrep.
0	6.50	15 %	5,23	—	—
12	6.70	18 %	—	—	—
24	6.40	28 %	4,30	—	—
36	6.75	65 %	—	—	—
48	7.30	85 %	3,06	645	—
60	6.85	85 %	—	—	—
72	6.90	95 %	—	1.000	32 %
84	6.80	77 %	—	—	—
96	6.80	55 %	1,08	1.220	8 %
108	6.75	74 %	—	—	—
120	6.80	65 %	0,73	1.330	8 %

Las cifras de azúcar indican el tanto por ciento del mismo que queda en el medio. Las cifras de estreptomicina son unidades por c. c., y las de manosido-estreptomicina el tanto por ciento de la misma en el medio por c. c. La representación gráfica de la fermentación es la figura 3.

Se observa crecimiento durante las primeras cuarenta y ocho horas; después se produce autolisis del micelio. El pH se mantiene casi invariable entre 6.5 y 7.5. El azúcar se va consumiendo durante toda la fermentación. La estreptomicina aumenta rápidamente a partir de las veinticuatro horas, llegando a un máximo a las cien horas; en cambio la manosido-estreptomicina disminuye rápidamente a partir de las setenta y dos horas. Se ve relación entre esta última y el azúcar.

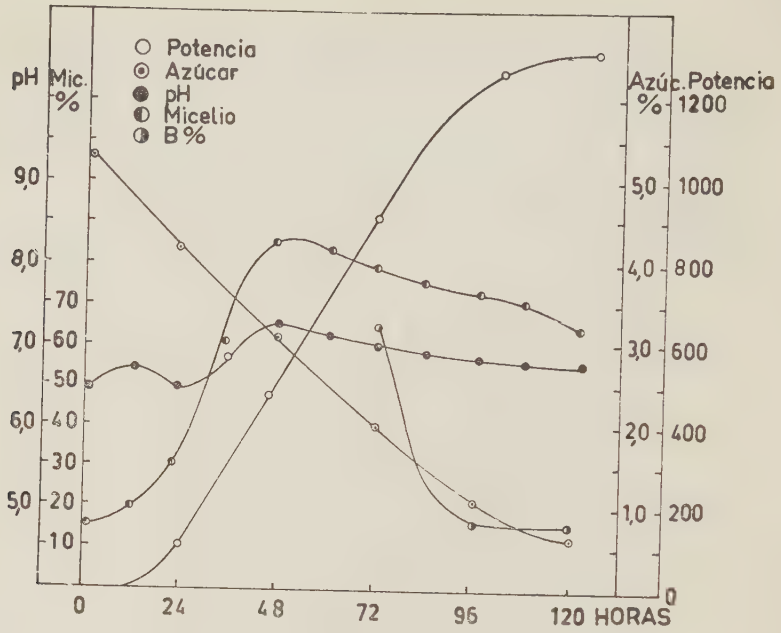


FIGURA 3.

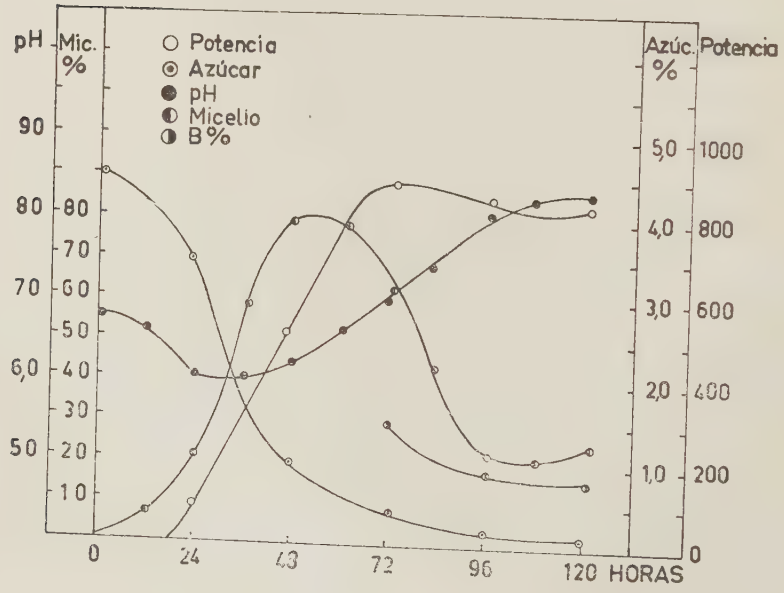


FIGURA 4.

A su vez, los resultados obtenidos en el medio sintético fueron los siguientes:

Horas	pH	Micelio	Azúcar	Estreptomicina	Manosido+estrep.
0	6.80	4 %	4,75	—	—
12	6.75	5 %	—	—	—
24	5.90	18 %	3,52	—	—
36	5.95	75 %	—	—	—
48	6.30	72 %	1,01	925	—
60	6.80	80 %	—	—	—
72	7.10	63 %	0,55	940	16 %
84	7.40	40 %	—	—	—
96	7.80	24 %	0,94	880	10 %
108	7.80	20 %	—	—	—
120	8.00	26 %	0,08	890	9 %

Las cifras indican lo mismo que las expresadas en la fermentación anterior. La representación gráfica es la figura 4.

Se observa crecimiento durante las primeras cuarenta y ocho horas; después se produce autolisis, muy rápida, del micelio. El pH se mantiene alrededor de 7.0 durante las primeras setenta horas, para después subir a 8.00 al final de la fermentación. El azúcar se consume rápidamente durante las primeras cuarenta y ocho horas, a partir de las cuales queda menos de un uno por ciento en el medio. La estreptomicina sube rápidamente de las veinticuatro a las setenta y dos horas, manteniendo y disminuyendo después este nivel máximo; la manosido-estreptomicina baja, aunque más lentamente que en el medio natural y menos.

Observando estas dos fermentaciones se pueden señalar dos fases en el metabolismo del *Streptomyces griseus,* que, de acuerdo con Dulaney (1949), llamaremos de "crecimiento" y "envejecimiento". Durante la primera, aumenta el micelio, se consume rápidamente el azúcar, el pH se mantiene alrededor de 7.0 y se produce poco antibiótico. Se puede fijar la duración de esta fase, en las condiciones realizadas por nosotros, de unas cuarenta y ocho horas. Durante la segunda fase, el micelio se autoliza, disminuyendo rápidamente; el pH sube ligeramente (más en

medio sintético que en natural), disminuye la velocidad de consumo de azúcar y se forma rápidamente antibiótico; al tiempo hay una rápida hidrolisis de manosido-estreptomicina, sobre todo en medio natural.

Observamos una correlación entre crecimiento, consumo de azúcar, pH, formación de estreptomicina e hidrolisis de manosido-estreptomicina. Esta correlación depende en parte de la alimentación del microorganismo, pues hay algunas diferencias entre el medio natural y el medio sintético.

Como complemento de estas experiencias se trata ahora de ver la influencia que sobre el crecimiento poseen algunos de los elementos nutritivos que pudieran considerarse innecesarios en el medio sintético. Para esto realizamos unas fermentaciones, en las condiciones señaladas en la parte de métodos, solamente que reduciendo a la mitad o suprimiendo alguno de los alimentos. Los resultados se observan a los doce días. El azúcar se consumió en todos los casos y los resultados de micelio y pH son los siguientes:

Medio	Micelio	pH	Medio	Micelio	pH
NORMAL. ...	30 %	8.0	NORMAL. ...	30 %	8.0
½ NO_3Na ...	18 %	8,2	Sin NO_3Na ...	15 %	8.2
½ c. s. l.	28 %	7.4	Sin c. s. l. ...	25 %	6.7
½ Mg..	20 %	8.1	Sin Mg.	—	—
½ Fe...	10 %	7,1	Sin Fe.	—	—
½ Mn.	10 %	7.3	Sin Mn.	—	—
½ Zn...	—	—	Sin Zn.	—	—

En primer lugar se observa la falta de crecimiento, en ausencia de magnesio, hierro, zinc y manganeso, y también aun cuando sólo exista la mitad de zinc. Esto corrobora trabajos de otros autores, que señalan la necesidad de hierro, zinc y manganeso.

Viendo el crecimiento y pH en los medios en que hubo desarrollo se observa, comparando con el medio normal, que disminución de hierro, zinc y magnesio bajan el crecimiento. La disminución del nitrato sódico también baja el crecimiento y mucho más si falta esta fuente de nitrógeno en el medio. El *corn-steep* no ejerce mucha influencia en el creci-

miento, en cambio sí en el nivel de pH, que baja bastante en ausencia de este elemento.

b) *Actividad α-glucosidasa exocelular e intracelular del* Streptomyces griseus.

Se determina la actividad enzimática de micelios producidos en medio natural y sintético, determinando también la actividad de filtrados de medio sintético.

La actividad se expresa en diferencias de fenol liberado por una muestra activa y otra inactiva (calentada a 100°/15 minutos). Como todas las muestras inactivas no dan liberación de fenol, los resultados vienen expresados por el fenol total liberado por la muestra. Los resultados obtenidos por actividad intracelular (micelio) son:

Horas	Sintético	Natural
0	—	—
12	735	—
24	150	645
36	15	90
48	150	72
60	150	69
72	150	69
84	150	69
96	150	150
108	150	315
120	165	375

Las cifras expresan gammas de fenol total liberado por la acción enzimática. La gráfica que representa estos resultados es la figura 5.

Se observa que en un medio natural, el contenido en α-glucosidasa intracelular disminuye durante los primeras treinta horas, no varía de treinta a noventa y seis horas y aumenta en las últimas veinticuatro horas. Esto coincide con el consumo rápido de azúcar en las primeras horas.

En el medio sintético, el contenido en α-glucosidasa intracelular baja rápidamente durante las veinticuatro primeras horas y luego no varía en todo el resto de la fermentación. Esto coincide con un mayor consumo de azúcar duarnte las primeras veinticuatro horas que en el caso del medio sintético.

En cuanto a los resultados de α-glucosidasa exocelular, se determina ésta en filtrados de medio sintético, expresando la actividad en la mis-

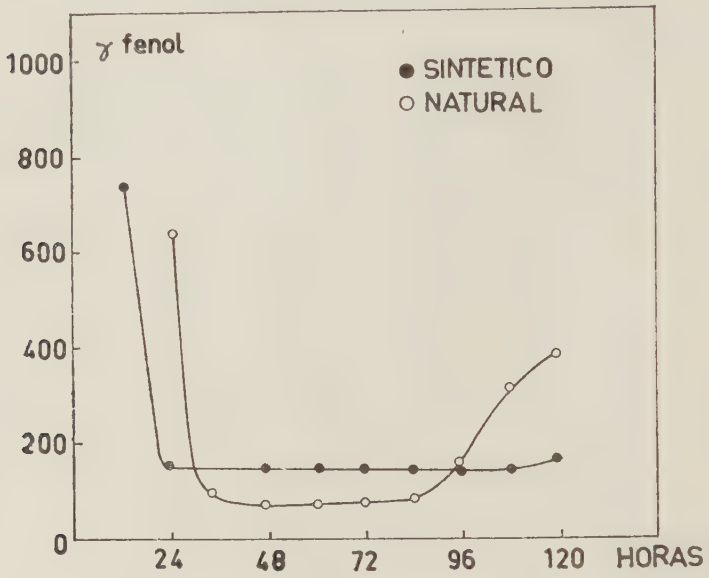


Figura 5.

ma forma que se dijo anteriormente. Según esto, tales resultados son los siguientes:

Horas... ...	24	48	72	96	120	144	168
Actividad...	—	—	180	270	180	120	135

Estas cifras indican gammas de fenol total liberados por acción enzimática. Por ellas se observa que la α-glucosidasa exocelular disminuye a partir de las noventa y seis horas. Parece existir cierta coincidencia en la cantidad de enzima exocelular e intracelular.

c) *Influencia de algunos factores en la actividad α-glucosidasa.*

Como decíamos anteriormente, en la actividad enzimática influyen una serie de factores que interesa señalar para la correcta caracterización del enzima. Los estudiados por nosotros son: concentración de enzima, pH, iones metálicos. Estos factores los estudiamos en la α-glucosidasa intracelular (micelio) procedente de medio natural y de medio sintético, para observar posibles diferencias. Los resultados son los siguientes:

Influencia de la relación sustrato/enzima.

Determinamos la llamada constante de Michaelis, es decir, la cantidad de sustrato necesaria para que el enzima dé más del 50 % de su actividad. Experimentalmente realizamos esto con micelios de doce horas (medio sintético) y de veinticuatro horas (medio natural), que muestran gran actividad α-glucosidasa. Se hacen controles con micelio inactivado (100°/15 minutos), que en ningún caso libera fenol. Los resultados son los siguientes:

Sustrato	Fenol total	Fenol teórico	%
250	153	91	100
1.250	375	455	82,4
2.500	450	910	49,4
6.250	810	2.275	35,6
12.500	1.440	4.555	31,6

Medio sintético.

Sustrato	Fenol total	Fenol teórico	%
250	153	91	100
1.250	258	455	56,7
2.500	390	910	42,8
6.250	720	2.275	31,6
12.500	1.215	4.555	26,7

Medio natural.

Todos los resultados se expresan en gammas de sustrato, fenol total y fenol teórico. La gráfica que expresa estos resultados es la figura 6.

La constante de Michaelis corresponde, en el caso de la α-glucosidasa intracelular (micelio) en medio natural, a 1,25 mgr. de fenil-glucosido; en el caso del enzima de medio sintético corresponde a 2,50 mgr. de fenil-glucósido.

Influencia del pH.

Existe un pH óptimo de actividad para cada enzima; nos interesa conocer el que corresponde a la α-glucosidasa intracelular de medio natural y de medio sintético: se preparan soluciones buffer para llevar la actividad de enzima a diferentes pH; para pH, 6.0, 7.0, 8.0, se utiliza buffer fosfato y para pH 9.0, se utiliza buffer glicocola. Se observa el fenol liberado por c. c. de muestra a cada pH. Los controles con enzima inactivo (micelio a 100°/15 minutos) no dan reacción de fenol. Los resultados son los siguientes:

pH	Sintético	Natural
6.0	3,00	3,00
7.0	19,50	12,50
8.0	20,50	17,00
9.0	13,00	13,00

Se realiza también con micelios de doce y veinticuatro horas, respectivamente. La gráfica que representa estos resultados es la figura 7.

Se observa que el pH óptimo de α-glucosidasa es en los dos casos de 7.8, es decir, de tipo alcalino y con mayor actividad la de medio sintético.

Influencia de iones metálicos.

Los iones metálicos tienden a aumentar o disminuir la actividad de los enzimas. Interesa conocer la acción de los que intervienen en el me-

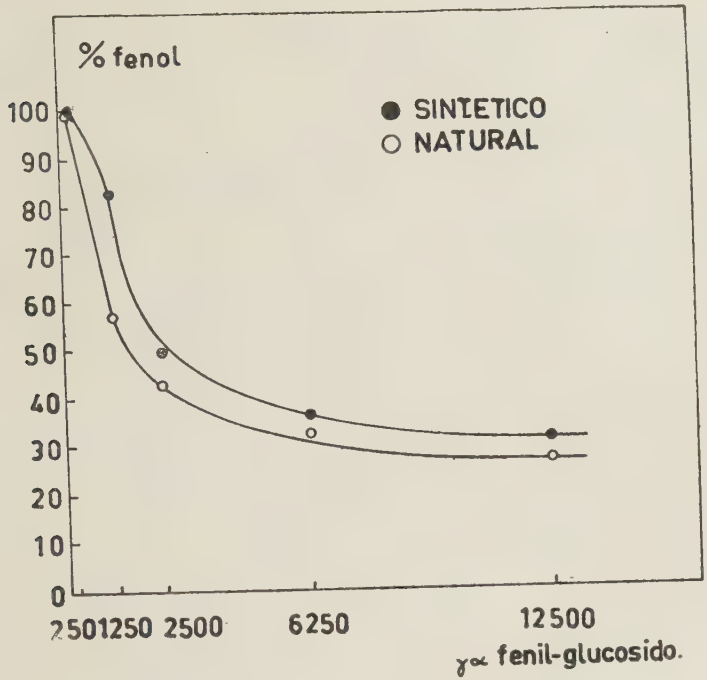


FIGURA 6.

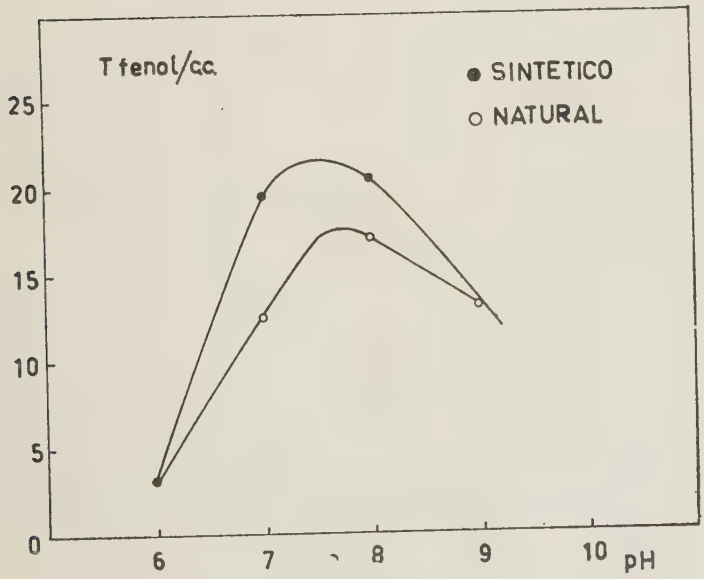


FIGURA 7.

tabolismo del *Streptomyces griseus*. Los que se estudian aquí son: magnesio, hierro, zinc y manganeso. Las necesidades de éstos en crecimiento ya se determinaron anteriormente. Veamos cómo actúa cada uno sobre la actividad α-glucosidasa de los micelios de medios natural y sintético de veinticuatro y doce horas, respectivamente.

Se sigue el método general de determinación de actividad enzimática, con la sola diferencia de adicionar diferentes cantidades de los metales en forma de sulfatos (1 c. c.), que varían de concentración molar (M) a 1 por 10^{-5} molar. En todos los casos, los controles de enzima inactivo (micelio a 100°/15 minutos) no dan liberación de fenol. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Magnesio		Sintético	Natural	Hierro		Sintético	Natural
	M	8,0	8,5		M	1,5	0,5
$1,10^{-1}$	M	9,0	13,0	1.10^{-1}	M	7,5	6,5
1.10^{-2}	M	15,5	14,0	1.10^{-2}	M	14,5	13,5
1.10^{-3}	M	15,5	14,0	1.10^{-3}	M	16,0	15,5
1.10^{-4}	M	15,5	14,0	1.10^{-4}	M	16,5	15,5
1.10^{-5}	M	15,5	14,0	1.10^{-5}	M	16,5	16,0
	—	16,0	14,0		—	16,0	15,5

Zinc		Sintético	Natural	Manganeso		Sintético	Natural
	M	0,0	0,0		M	6,0	6,0
1.10^{-1}	M	0,0	0,0	1.10^{-1}	M	12,5	10,0
1.10^{-2}	M	0,0	0,0	1.10^{-2}	M	12,5	12,5
1.10^{-3}	M	9,5	2,0	1.10^{-3}	M	12,5	12,5
1.10^{-4}	M	16,0	11,0	1.10^{-4}	M	12,5	12,5
1.10^{-5}	M	16,0	15,5	1.10^{-5}	M	12,5	12,5
	—	16,0	15,5		—	12,5	12,0

Los resultados anteriores se dan en gammas de fenol por c. c. Las gráficas de los anteriores resultados son las figuras 8, 9, 10 y 11.

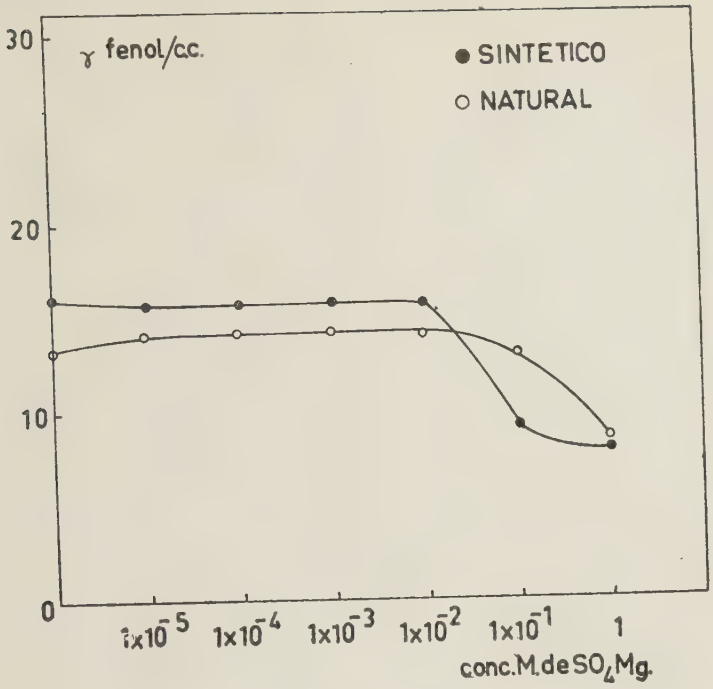


FIGURA 8.

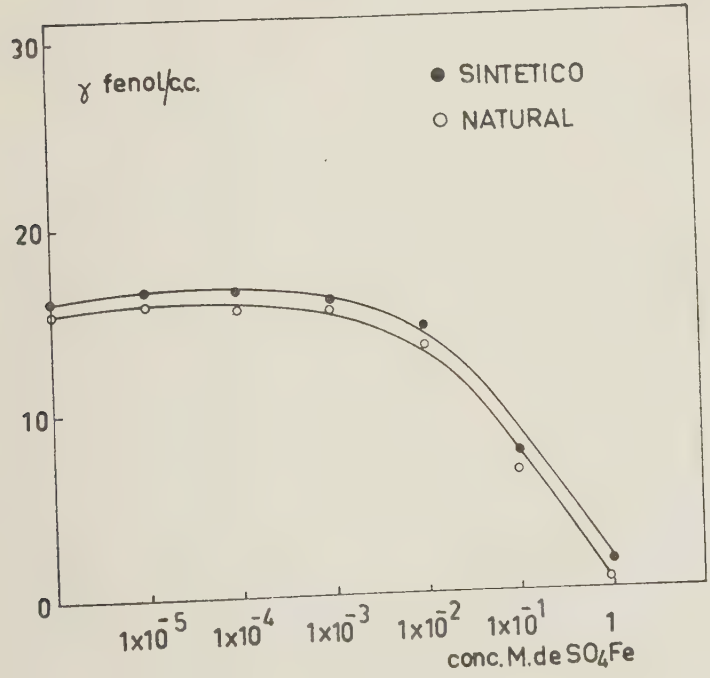


FIGURA 9.

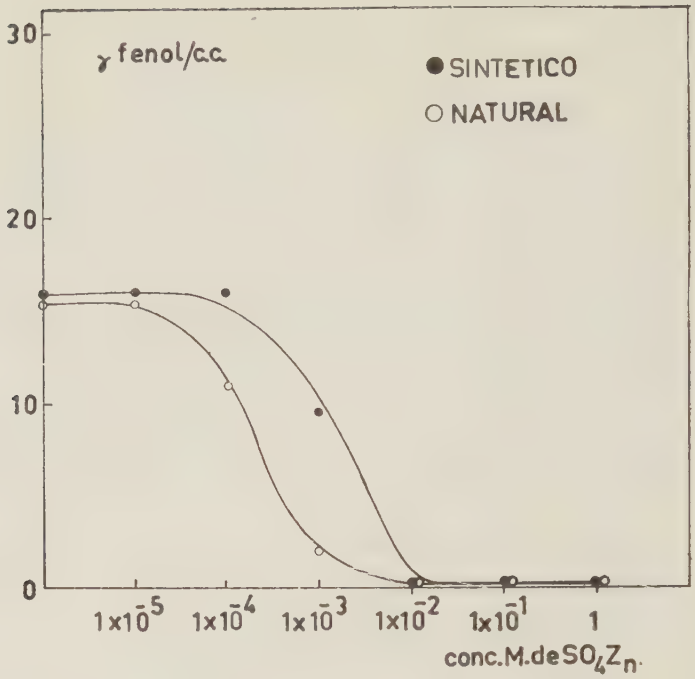


FIGURA 10.

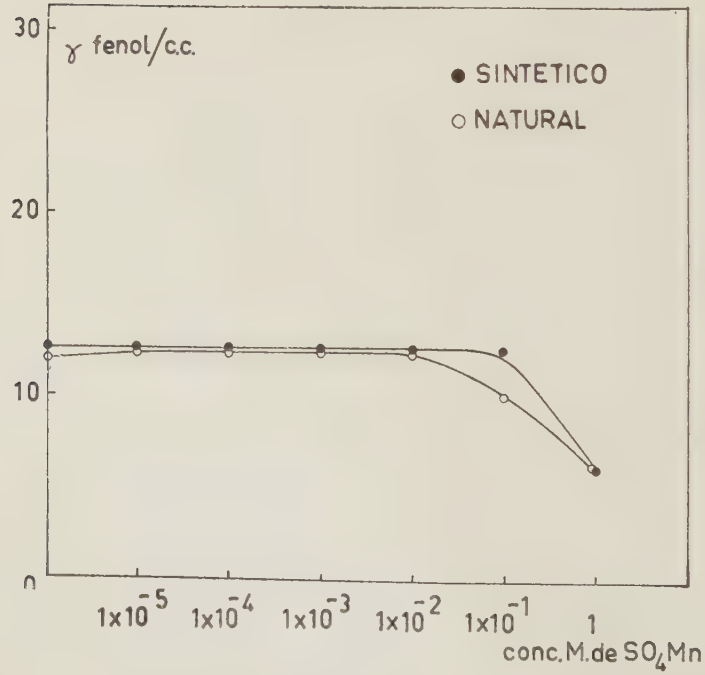


FIGURA 11.

Observando las cifras y gráficas anteriores se deduce que las concentraciones mínimas a las que actúan los diferentes metales sobre la α-glucosidasa son, respectivamente:

Magnesio ... ... = 1.10^{-2} M.
Hierro ... ... = 1.10^{-3} M.
Zinc.. ... ... = 1.10^{-5} M.
Manganeso... ... ... = 1.10^{-1} M.

A partir de las concentraciones anteriores los iones metálicos mencionados disminuyen un 100 % la actividad enzimática, a excepción del magnesio, que sólo la disminuye un 50 %. De las cifras anteriores se deduce también que la actividad α-glucosidasa está muy relacionada con el contenido en zinc del medio y menos con el de hierro. En el caso del zinc a una concentración de 1.10^{-2} M, y en el del hierro a concentración M, se anula la actividad de este enzima.

d) *Influencia de algunos componentes del medio sintético en la actividad α-glucosidasa.*

Esta parte experimental hay que realizarla con los componentes del medio que permitan el crecimiento del micelio para poder utilizar éste como fuente de enzima.

De estos componentes que permiten crecimiento se observa su influencia en la actividad α-glucosidasa, si se suprimen o se reduce su cantidad. Se estudia esto sobre la actividad exocelular y la intracelular.

Se hace con cultivos de medio sintético; a los doce días de fermentación, se prueban enzimas inactivos (micelio o filtrado a 100°/15 minutos), que no liberan fenol. Los demás resultados son los siguientes:

Medio	Filtrado	Micelio
Normal...	—	—
½ NO_3Na... ...	—	—
Sin NO_3Na... ...	—	—
½ corn steep ...	—	—
Sin corn steep...	—	—
½ magnesio... ...	—	—
½ hierro..	1,5	—
½ manganeso ...	1,5	—

En el enzima intracelular no se observa actividad alguna, en ninguno de los casos; en el exocelular ocurre lo mismo, a no ser en los medios en que se pone la mitad de hierro y manganeso.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Tratamos de establecer una relación entre la nutrición general del *Streptomyces griseus* y su crecimiento y producción de antibióticos. Para esto seguimos su desarrollo en un medio natural y en un medio sintético, señalando la existencia de dos fases de metabolismo: crecimiento y envejecimiento con características propias. Al tiempo de observar la influencia de los elementos nutritivos en general, vemos la influencia de algunos iones metálicos en el crecimiento, con la necesidad de magnesio, hierro manganeso y zinc para el desarrollo del mismo.

En relación con la nutrición del *Streptomyces griseus* y también con la producción de sustancias de metabolismo, está la producción de enzimas por la célula. En relación con éstos estudiamos aquellos que pueden tener intervención en la biosíntesis o degradación de la estreptomicina. En este primer trabajo estudiamos la producción y características de la α-glucosidasa, ya exocelular, ya intracelular.

La glucosidasa intracelular (micelio), se produce tanto en medio natural como sintético, y en gran cantidad durante las primeras veinticuatro-treinta horas, lo que coincide con el rápido consumo de azúcar, para después no variar hasta el final de la fermentación, a no ser en medio natural que vuelve a producirse algo de enzima en las últimas veinticuatro horas. Estos resultados coinciden en parte con el metabolismo de la α-glucosidasa exocelular.

Estudiando a continuación los factores que pueden influir en la actividad α-glucosidasa, tanto de medio natural como de medio sintético, se observa que la constante de Michaelis corresponde en el caso del enzima intracelular en medio natural a 1,25 mgr. de sustrato, mientras que el procedente de medio sintético corresponde a 2,50 mgr. de sustrato. El pH óptimo de actividad es en los dos casos de 7.8. Los iones metálicos influyen en la actividad del enzima, tanto procedente de medio sintético como natural, a partir de una determinada concentración, que en nuestro caso es: 1.10^{-2} M. para el magnesio, 1.10^{-3} M. para el hierro, 1.10^{-5} M. para el zinc y 1.10^{-2} M. para el manganeso; a partir de estas concentraciones baja la actividad α-glucosidasa en un 100 %, a no ser el magnesio que lo hace en un 50 %. El zinc a concentración 1.10^{-2} M. y el hierro a concentración M. inhiben completamente la actividad α-glucosidasa del *Streptomyces griseus*.

SUMMARY.

In the present paper we try to establish a relationship between the production and characters of α-glucosidase and the biosynthesis or degradation of streptomycine.

During the fermentation of streptomycine, the exo-α and endo-α-glucosidase has an optimum in production after 24-30 hours which coincides with the most rapid consumption of sugar.

The most important factors having an influence on the activity of this enzyme are being studied, such as: their Michaelis's constant, the optimum pH and the concentration of some metallic ions such as magnesium, zinc, irón and manganese.

BIBLIOGRAFIA

G. C. Ainsworth y otros. J. Gen. Microbiol. I. 335. 1947.
E. O'Brien & G. H. Wagman & D. Perlman. Bact. Proc. 26. 1952.
G. A. Lepage & E. J. Campbell. J. Biol. Chem. 162. 163. 1946.
H. H. Thornberry. Phytoph. 36. 412. 1946.
H. B. Woorruff. J. Bacteriol. Abcs. Proc. 54. 42. 1947.
C. G. C. Chesters & G. N. Rolinson. J. Gen. Microbiol. 4. I. 1950.
C. G. C. Chesters & G. N. Rolinson. J. Gen. Microbiol. 5. 559. 1951.
E. L. Dulaney & D. Perlman. Bull. Torrey Bot. Club. 74. 504. 1947.
E. L. Dulaney & A. B. Hodges & D. Perlman. J. Bacteriol. 54. I. 1947.
E. L. Dulaney. Mycologia. 41. I. 1947.
D. J. D. Hockenhull & K. H. Fantes & M. Herbert & B. Whitehead. J. Gen. Microbiol. 10. 353. 1945.
J. L. Stokes. Ann. Rev. Microbiol. 6. 29. 1952.
W. H. Hugo. Bacteriol. Revs. 18. 87. 1954.
S. P. Colowick & N. O. Kaplan. Methods in Enzimology. 1955.
F. Bernheim. Biochem. J. 22. 1178. 1928.
E. F. Gale. Adv. Enzimology. 6. I. 1946.
G. W. E. Plaut & H. A. Lardy. J. Biol. Chem. 180. 13. 1949.
R. M. Hochester & J. H. Quastel. Arch. Biochem. Biophys. 31. 278. 1951.
C. T. Gray. J. Bacteriol. 63. 813. 1952.
Wood & Gunsalus & Umbreit. J. Biol. Chem. 170. 313. 1947.
Shaffer & Somogyi. J. Biol. Chem. 100. 695. 1933.
D. C. Grove & W. A. Randall. Assay Methods of Antibiotics. 1955.
S. Gottlied & P. B. Marsch. Ind. Eng. Chem. Anal. 18. 16. 1946.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

DETERMINACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON VIRUS ANTIVARIOLICO

(Conclusión.)

POR

María del Rosario de ZUAZO AGUIRRE

Suero número 26.

Procedente de conejo inoculado con el líquido sobrenadante obtenido tras centrifugar un triturado de pulpa vacunal de ternera suspendido al 2 % en caldo glucosado ajustado a pH 8 y con un filtrado obtenido a partir del mismo líquido, en las suspensiones de 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800, partiendo de centrifugado y filtrado puro. Virus activo. Sangría, a los *veinte días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada diez días.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	Puro	10^{-2}	20^{-2}	40^{-2}	80^{-2}
Centrifugado	30 mm.	20 mm.	18 mm.	17 mm.	17 mm.
Filtrado	20 —	10 —	9 —	9 —	8 —

TITULACIÓN DEL SUERO.

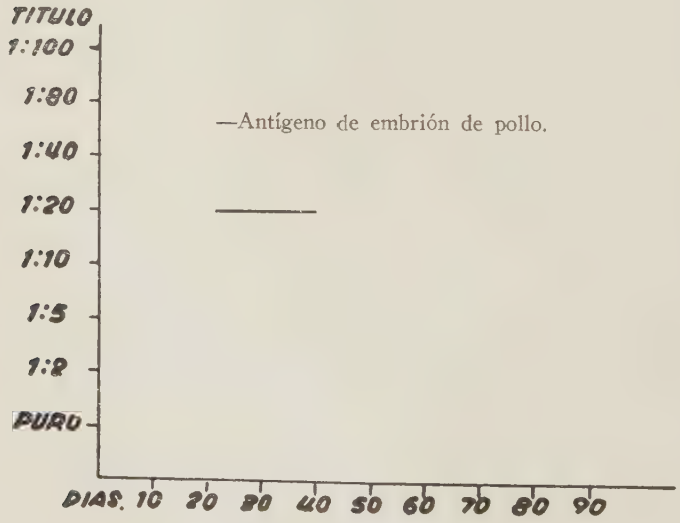
Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	1.ª sangría, a los 20 días.....	4	4	4	3	2	±	0	0
	2.ª " 30 "	4	4	4	3	2	0	0	0
	3.ª " 40 "	4	4	4	3	2	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 26.

Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los veinte días ... ... Título 1/20
Segunda sangría, a los treinta días... ... ... — 1/20
Tercera sangría, a los cuarenta días .... — 1/20

Muere a los cuarenta y cinco días.



CURVA 9.

Suero número 30.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera* al 1/10, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 en glicerina y en solución salina. Virus activo. Sangría a los *quince días.*

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina...	21 mm.	17 mm.	13 mm.	11 mm.	5 mm.
Solución salina	24 —	18 —	16 —	15 —	14 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	3	3	2	2	±	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	4	4	3	3	2	2	1	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	4	4	3	3	3	2	1
Control suero..		2	1	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 30.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/40
Con antígeno de testículo de conejo. ... ... — 1/40
Con antígeno de membranas alantoideas. ... ... — 1/80

Suero número 31.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera* al 1/10, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, en glicerina y en solución salina. Virus activo. Sangría, a los quince días de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina...	20 mm.	10 mm.	8 mm.	7 mm.	2 mm.
Solución salina..	21 —	11 —	10 —	7 —	3 —

Titulación del suero.

	Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	3	3	3	2	0	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	3	3	3	2	1	0	0	0
	Pústulas piel conejo, al 1/2 ...	3	3	2	±	0	0	0	0
	Neurovacuna avirulento; puro	2	1	0	0	0	0	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	3	3	2	2	0	0	0	0
	Cerebro virul. de ratón, *b*) 1/3.	2	2	2	±	0	0	0	0
	Membranas alantoideas 1/6 ...	4	4	3	3	2	1	0	0
	Embrión de pollo, al 1/5	3	3	3	2	1	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 31.

Con pulpa vacunal de ternera.	Titulo	1/20
Con antígeno de testículo de conejo...	—	1/10
Con antígeno de pústulas de piel de conejo.	—	1/5
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado)... ...	—	puro
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)	—	1/10
Con antígeno de cerebro virulento de ratón *b*)...	—	1/5
Con antígeno de membranas alantoideas	—	1/20
Con antígeno de embrión de pollo	—	1/20

Suero número 34.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1./1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *catorce días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	26 mm	20 mm.	16 mm.	10 mm.	4 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero..		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	3	2	2	1	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	4	3	3	2	2	1	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	4	4	3	2	2	1	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 34.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/20
Con antígeno de testículo de conejo... ... ... — 1/20
Con antígeno de membranas alantoideas. ... ... — 1/40

Suero número 35.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1./1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *trece días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	22 mm.	18 mm.	13 mm.	8 mm.	3 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

	Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	3	3	3	2	±	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	3	3	3	2	2	1	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	3	3	3	3	2	1	0
	Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 35.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/20
Con antígeno de testículo de conejo ... ... — 1/20
Con antígeno de membranas alantoideas... ... ... — 1/40

Suero número 36.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *doce días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	24 mm.	20 mm.	15 mm.	10 mm.	6 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	3	3	2	1	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	4	3	3	3	2	1	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 36.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/20
Con antígeno de membranas alantoideas... ... ... — 1/40

Suero número 37.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *once días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	21 mm.	18 mm.	16 mm.	13 mm.	6 mm.	2 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero..		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	3	3	2	1	±	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	3	3	3	3	2	1	±	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 37.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/10
Con antígeno de membranas alantoideas. ... ... — 1/20

Suero número 38.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/ 1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *diez días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	20 mm.	15 mm.	10 mm.	6 mm.	3 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de pulpa vacunal de ternera, al 1/7	1.ª sangría, a los 10 días.....	3	3	3	2	1	±	0	0
	2.ª " 190 "	3	2	2	±	0	0	0	0
	3.ª " 230 "	2	2	1	0	0	0	0	0
	4.ª " 270 "	2	±	0	0	0	0	0	0
	5.ª " 305 "	2	±	0	0	0	0	0	0
Antígeno de membranas alantoideas, al 1/6	1.ª " 10 "	3	3	2	2	1	1	0	0
	2.ª " 190 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	3.ª " 230 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	4.ª " 270 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	5.ª " 305 "	3	3	2	1	0	0	0	0
Control suero		0	0	0	0	0	0	0	0

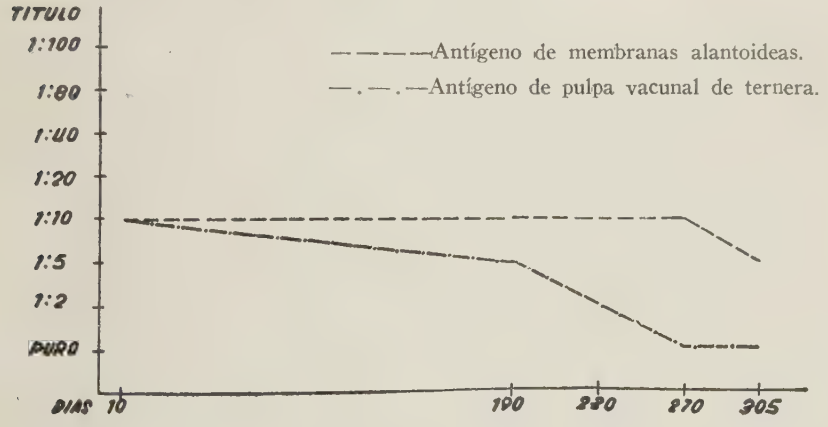
Resultados obtenidos con el suero número 38.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera:

Primera sangría, a los diez días...	Título	1/10
Segunda sangría, a los ciento noventa días	—	1/5
Tercera sangría, a los doscientos treinta días	—	1/2
Cuarta sangría, a los doscientos setenta días...	—	puro
Quinta sangría, a los trescientos cinco días	—	puro

Con antígeno de membranas alantoideas:

Primera sangría, a los diez días	Título	1/10
Segunda sangría, a los ciento noventa días	—	1/10
Tercera sangría, a los doscientos treinta días	—	1/10
Cuarta sangría, a los doscientos setenta días	—	1/10
Quinta sangría, a los trescientos cinco días...	—	1/5



Curva 10.

Suero número 39.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensinoes, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *nueve días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	26 mm.	25 mm.	20 mm.	15 mm.	5 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

	Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	3	3	2	1	±	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	3	3	3	2	1	0	0
	Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 39.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/10
Con antígeno de membranas alantoideas ... ... — 1/20

Suero número 41.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las suspensiones siguientes, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *siete días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	25 mm.	20 mm.	16 mm.	10 mm.	6 mm.	3 mm.

Titulación del suero.

	Diluciones del suero...	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	3	2	2	1	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	3	3	2	2	1	0	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	4	3	2	2	1	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 41.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/20
Con antígeno de testículo de conejo... ... ... — 1/10
Con antígeno de membranas alantoideas... ... ... — 1/20

Suero número 42.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *seis días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	22 mm.	18 mm.	15 mm.	10 mm.	7 mm.	3 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	3	2	2	1	0	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6	4	3	2	2	1	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 42.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/10
Con antígeno de membranas alantoideas. ... ... — 1/10

Suero número 43.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *cinco días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	24 mm.	20 mm.	15 mm.	9 mm.	6 mm.	3 mm.

Titulación del suero.

	Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	2	2	1	0	0	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	2	2	0	0	0	0	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	4	3	2	2	1	0	0	0
	Control suero..	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 43.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera... ... ... Título 1/5
Con antígeno de testículo de conejo... ... ... — 1/2
Con antígeno de membranas alantoideas. ... ... — 1/10

Suero número 44.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las siguientes suspensiones, en solución salina: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *cuatro días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	15 mm.	10 mm.	8 mm.	3 mm.	0 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	2	1	0	0	0	0	0	0
	Testículo de conejo, al 1/6 ...	±	0	0	0	0	0	0	0
	Membranas alantoideas, al 1/6.	2	2	±	0	0	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 44.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título puro
Con antígeno de testículo de conejo ... ... — 0
Con antígeno de membranas alantoideas... ... ... — 1/2

Suero número 49.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las suspensiones de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y /1.000.000, en solución salina. Sangría, a los *tres días.*

Esquema de las lesiones a los tres días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	10 mm.	7 mm.	3 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	25 mm.	20 mm.	15 mm.	16 mm.	10 mm.	7 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de pulpa vacunal de ternera, al 1/7	1.ª sangría, a los 3 días ..	±	0	0	0	0	0	0	0
	2.ª " 5 " ..	3	2	2	1	0	0	0	0
	3.ª " 11 " ..	4	4	3	3	3	2	±	0
	4.ª " 29 " ..	4	4	4	3	3	2	1	0
Antígeno de testículo de conejo al 1/6	1.ª " 3 " ..	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.ª " 5 " ..	2	2	2	1	0	0	0	0
	3.ª " 11 " ..	4	4	3	3	2	1	0	0
	4.ª " 29 " ..	4	4	3	3	2	2	0	0
Antígeno de membranas alantoideas al 1/6	1.ª " 3 " ..	1	±	0	0	0	0	0	0
	2.ª " 5 " ..	3	3	2	2	±	0	0	0
	3.ª " 11 " ..	4	4	4	3	3	2	1	0
	4.ª " 29 " ..	4	4	4	3	3	2	1	0
Control suero....		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 49.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera:

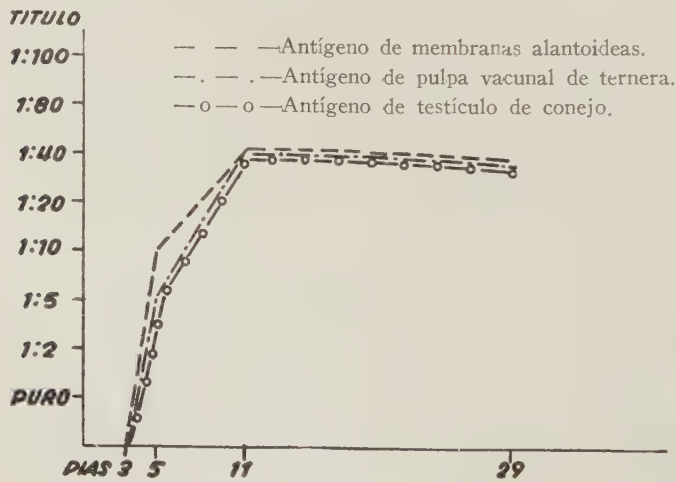
Primera sangría, a los tres días ... ... Título 0 (1)
Segunda sangría, a los cinco días... ... ... — 1/5
Tercera sangría, a los once días ... ... — 1/40
Cuarta sangría, a los veintinueve días. ... ... — 1/40

Con antígeno de testículo de conejo:

Primera sangría, a los tres días ... ... Título 0
Segunda sangría, a los cinco días... ... ... — 1/5
Tercera sangría, a los once días ... ... — 1/20
Cuarta sangría, a los veintinueve días. ... ... — 1/40
Muere el conejo a los treinta días.

Con antígeno de alantoides:

Primera sangría, a los tres días ... ... Título 0 (2)
Segunda sangría, a los cinco días... ... ... — 1/10
Tercera sangría, a los once días ... ... — 1/40
Cuarta sangría, a los veintinueve días. ... ... — 1/40



Curva 11.

(1) El suero puro presenta una fijación de ±.
(2) El suero puro presenta una fijación de 1, y diluído al 1/2, una fijación de ±.

Suero número 50.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *pulpa vacunal de ternera,* en las suspensiones de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000. 1/100.000 y 1/1.000.000, en solución salina. Primera sangría, a las *veinticuatro horas.*

Esquema de las lesiones a las veinticuatro horas.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	6 mm.	3 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.

Se aprecian dos pequeñas lesiones.

Esquema de las lesiones a los dos días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	12 mm.	8 mm.	3 mm	0 mm.	0 mm.	0 mm.

Se aprecian tres lesiones.

Segunda sangría, a los *dos días.*

Esquema de las lesiones a los tres días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	18 mm.	12 mm.	4 mm.	± mm.	0 mm.	0 mm.

Tercera sangría, a los *tres días.*

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	0^{-6}
Solución salina...	18 mm.	9 mm.	6 mm.	3 mm.	1 mm	1 mm.

Cuarta sangría, a los *seis días.*

TITULACIÓN DEL SUERO.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de pulpa vacunal de ternera, al 1/7	1.ª sangría, a las 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.ª " a los 2 días ..	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.ª " " 3 días ..	±	0	0	0	0	0	0	0
	4.ª " " 6 días ..	2	2	1	±	0	0	0	0
Antígeno de testículo de conejo, al 1/6	1.ª " 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.ª " a los 2 días ..	0	0	0	0	0	0	0	0
	3.ª " " 3 días ..	0	0	0	0	0	0	0	0
	4.ª " " 6 días ..	2	1	±	0	0	0	0	0
Antígeno de membranas alantoideas, al 1/6	1.ª " 24 horas	0	0	0	0	0	0	0	0
	2.ª " a los 2 días ..	±	0	0	0	0	0	0	0
	3.ª " " 3 días ..	1	1	±	0	0	0	0	0
	4.ª " " 6 días ..	3	2	2	1	0	0	0	0
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 50.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera:

Primera sangría, a las veinticuatro horas ... ... Título 0
Segunda sangría, a los dos días ... ... — 0
Tercera sangría, a los tres días ... ... — 0 (1)
Cuarta sangría, a los seis días ... ... — 1/2

Con antígeno de testículo de conejo:

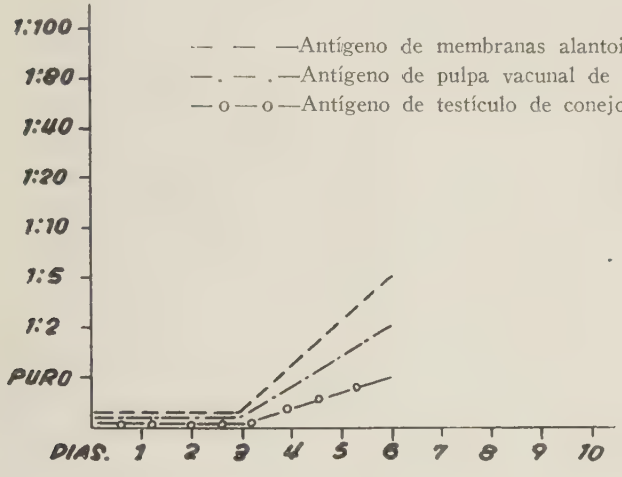
Primera sangría, a las veinticuatro horas ... ... Título 0
Segunda sangría, a los dos días ... ... — 0
Tercera sangría, a los tres días ... ... — 0
Cuarta sangría, a los seis días... ... ... — puro

(1) El suero puro presenta una fijación de ±.

Con antígeno de membranas alantoideas:

Primera sangría, a las veinticuatro horas ... ... Título o
Segunda sangría, a los dos días ... ... — o (1)
Tercera sangría, a los tres días ... ... — o (2)
Cuarta sangría, a los seis días ... ... — 1/5

Muere el animal inmediatamente después de la cuarta sangría.



Curva 12.

(1) El suero puro presenta una fijación de ±.

(2) El suero puro y la dilución al 1/2 presentan una fijación de 1, y la dilución al 1/5, una fijación de ±.

ESTUDIOS DE NUESTROS EXPERIMENTOS

Antígenos.

De los diez antígenos preparados y ensayados, tan sólo uno, el de cerebro virulento de ratón en su porción (a), fué desechado por su poder anticomplementario. Los de pústulas de piel de conejo y de neurovacuna avirulento no pusimos interés en reponerlos después de los primeros ensayos en que dieron un bajo título.

Para la titulación de nuestros antígenos sólo utilizamos el suero número 13, procedente de un conejo albino de gran peso (2,700 grs.), que nos proporcionó suero suficiente para ser primeramente ensayado frente a la mayoría de los antígenos y posteriormente para la definitiva titulación de todos. Este proceder nos ha permitido establecer una gradación de títulos sin los errores propios de las diferencias individuales que imprime cada conejo a su suero.

En el curso de nuestras experiencias hemos podido comprobar que los antígenos de bajo título, pústulas de piel de conejo (1/2), neurovacuna avirulento (1/2), neurovacuna virulento (1/3), y cerebro de ratón en su porción (b) (1/3), fueron los menos sensibles ante los sueros más ricos en anticuerpos fijadores del complemento. También pudimos comprobar que el de pulpa vacunal de ternera que fué el de título más alto (1/7) y demostró ser un gran antígeno, no llegó a la sensibilidad de los preparados con elementos embrionarios de huevos de gallina incubados.

Sueros.

Los conejos correspondientes a los sueros números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 40, fueron inoculados con *suspensiones de embrión de pollo* en punturas intradérmicas.

En el animal correspondiente al *suero número* 5, el virus fué inoculado después de una permanencia de cincuenta días a temperatura de 18° a 22° C. Las punturas dieron lugar a pequeñas lesiones y la sangría se efectuó a los ciento nueve días.

La atenuación del virus y la fecha de la sangría, pudieron ser las

causas del bajo título obtenido frente a dos de nuestros mejores antígenos. (Véase esquema y títulos.)

El animal correspondiente al *suero número* 6 fué inoculado con virus ligeramente atenuado (treinta y cinco días a temperatura de 18° a 22° C.) Las punturas dieron lugar a lesiones normales, y la sangría se efectuó a los treinta y ocho días.

Este suero presentó la particularidad de haber dado título alto frente a los antígenos utilizados y un gran poder anticomplementario.

Los *sueros números* 10 *y* 11, correspondientes a conejos que presentaron grandes lesiones y fueron sangrados a los veintitrés días, dieron títulos muy altos. El número 10, con los tres antígenos que se utilizaron, y el número 11, con dos de ellos, en contraste con el bajo título conseguido por este último frente al antígeno de cerebro de ratón (b).

El *suero número* 40, correspondiente a un conejo con pequeñas lesiones en las punturas de las suspensiones 1/10.000 y 1/100.000 inapreciable en la 1/1.000.000. Se le efectuaron cinco sangrías. La primera, a los ocho días de su inoculación; la segunda, a los doscientos; la tercera, a los doscientos sesenta y cinco días; la cuarta a los doscientos ochenta, y la quinta, a los doscientos noventa y cinco. El suero de la primera sangría dió buenos títulos con los antígenos; el de la segunda, bajó grandemente; el de la tercera, llega al límite de la titulación, que persiste en los de la cuarta y quinta.

Los conejos correspondientes a los sueros 12, 13, 17 y 18 fueron inoculados con suspensiones de triturados de *membranas alantoideas*; presentaron grandes lesiones en las punturas. (Véase esquema). Los dos primeros fueron sangrados a los veinticinco días, y los otros dos, a los veintiuno.

Los cuatro sueros dieron altos títulos con los antígenos de embrión de pollo, alantoides y pulpa vacunal de ternera, y el número 12, un título de tipo medio con el de cerebro de ratón (b).

Los sueros 14, 19 y 20 proceden de conejos inoculados con suspensiones de triturados de *vísceras de embriones de pollo.*

De estos sueros merece consignarse el número 19, procedente de un conejo que presentó pocas y pequeñas lesiones, a pesar de lo cual dió un alto título que contrastó también con su acusado poder anticomplementario. (Véase esquema.)

Los conejos correspondientes a los sueros 15, 16, 21 y 22 fueron inoculados con suspensiones de triturados de *cuerpos de embriones de pollo*. Las lesiones observadas en los animales de los sueros números 15 y 16 fueron de buen tamaño; las del número 21, nulas en la mayoría de las punturas, y las del número 22, algunas negativas y las restantes de discreto tamaño. (Véanse esquemas).

El primero de estos sueros dió un alto título y gran poder anticomplementario. De los otros tres sueros de título medio, los números 21 y 22 fueron también anticomplementarios.

Este grupo de sueros se caracterizó por su poder anticomplementario.

Los conejos correspondientes a los sueros números 32 y 33 se inocularon primeramente con una suspensión de *triturado de embrión de pollo* en punturas intradérmicas. Al animal del suero número 32 se le practicaron, a partir del día cuarenta y dos, tres inyecciones intraperitoneales de una suspensión de *triturado de neurovacuna* al 1/10 de 1, 2 y 4 c. c., con intervalos de diez días, y al animal del suero número 33, las mismas cantidades por la misma vía y con los mismos intervalos, a partir del día cincuenta y dos.

La única particularidad de estos dos sueros fué el título nulo del 33 con el antígeno de neurovacuna avirulento.

Los conejos correspondientes a los sueros 47 y 48 fueron inoculados por vía subcutánea con triturados de neurovacuna al 1/10 en cantidades de 1, 2 y 4 c. c., con intervalos de cuatro días; por vía intraperitoneal, 6 c. c., a los cuatro días de la última subcutánea, y por vía intracerebral, 0,30 c. c., a los cuatro días de la peritoneal.

El suero número 47 presentó poder anticomplementario y título medio con el antígeno de neurovacuna virulento, y el número 48, título bajo con el de neurovacuna avirulento; alto, con el de pulpa vacunal de ternera, y medio, con el de neurovacuna virulento.

El conejo correspondiente al suero número 23 fué inoculado con una suspensión de *triturado de cerebro de ratón*. Dió títulos medios con los sueros de las dos primeras sangrías, bajando grandemente en la tercera, practicada a los cuarenta días. Muere el animal a los cuarenta y tres días.

Al conejo correspondiente al suero número 27, inoculado con suspensiones de triturados de *testículo de conejo*, que no presentó grandes lesiones en las punturas, se le practicaron nueve sangrías: la primera, a

los veinte días, y la última, a los cien días. El título del suero que no sufrió variaciones hasta los setenta días (1/40), baja al 1/20 a los ochenta y noventa días, y al 1/10, a los cien. (Véase resultados de titulación y curva.)

El conejo correspondiente al suero número 25, inoculado con suspensiones de triturados de *hígado y cerebro* de un animal (conejo) infectado con neurovacuna mediante punturas intradérmicas, no presentó lesiones en las de hígado, y las de cerebro fueron pequeñas. El título de este suero fué de 1/10.

El conejo correspondiente al suero número 45, inoculado con suspensiones de triturados de *bazo y testículo* de un animal (conejo) infectado en piel con neurovacuna, no presentó lesiones aparentes en las punturas. (Véase esquema.)

El suero de la primera sangría, efectuada a los setenta días, dio un título de 1/10; a los noventa, de 1/5, y a los ciento diez días, de 1/2. (Véanse resultados y curva.)

El conejo correspondiente al suero número 46, inoculado con suspensiones de triturados de *cerebro y de hígado* de un animal (conejo) infectado con neurovacuna, no dio lugar a lesiones aparentes en ninguna de las punturas practicadas. (Véase esquema.)

El suero de la primera sangría, efectuada a los veinte días, dio un buen título (1/40). El de las cuatro siguientes se mantiene al 1/20, y las dos últimas, al 1/10 y 1/5, respectivamente. (Véanse resultados y curva.)

Los conejos correspondientes a los sueros números 28 y 29 fueron inoculados con suspensiones de *triturados de neurovacuna y pulpa vacunal de ternera* sometidos a incubación en estufa a 37° C., durante veinticuatro y cuarenta y ocho horas, respectivamente. Los dos animales presentaron lesiones de buen tamaño en las punturas, y se sangraron por primera vez a los veinte días de las inoculaciones.

Los anticuerpos persistieron hasta los ciento ochenta días en el suero número 28, y hasta los ciento sesenta, en el suero 29. (Véanse esquemas, resultados y curvas.)

El conejo correspondiente al suero número 24 fue inoculado por el método de *escarificación cutánea,* con una suspensión al 1/10 de un *triturado de pulpa vacunal de ternera.* El animal presentó a los cuatro

días una erupción confluente, con intensa reacción febril y pérdida de peso.

La primera sangría se efectuó a los cincuenta y cinco días de la inoculación, estando ya el animal completamente repuesto y desprendidas las costras de la superficie escarificada, y la catorce y última, a los doscientos cincuenta días. El alto título del suero de la primera (1/80), fué decreciendo lentamente, persistiendo los anticuerpos hasta los doscientos cincuenta días en que muere el animal, poco después de la catorce sangría. (Véanse resultados y curva.)

El conejo correspondiente al suero número 26 fue inoculado intradérmicamente con un *filtrado y un centrifugado de pulpa vacunal de ternera* y presentó buenas lesiones en todas las punturas. El suero dio un título de 1/20 en la primera sangría, efectuada a los veinte días, que conservó en las otras dos, a los treinta y cuarenta. (Véanse esquema y resultados).

Con *pulpa vacunal de ternera* fueron inoculados los conejos correspondientes a los sueros números 30, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 49 y 50. De este grupo, el número 30 dió buenos títulos con los tres antígenos utilizados; el número 31, títulos bajos con todos nuestros antígenos, a pesar de haber presentado el animal buenas lesiones en las punturas; los números 34, 35, 36, 37, 38 y 39, títulos de tipo medio y bajo, y los números 41, 42, 43 y 44, procedentes de animales sangrados a los siete, seis, cinco y cuatro días, respectivamente, el título no pasó de 1/20 en el primero, y totalmente negativo con uno de los antígenos en el último. (Véanse esquemas y cuadros.)

El conejo correspondiente al suero número 49 fue sangrado a los tres, cinco, once y veintinueve días. Cuando se efectuó la primera sangría (tres días), el animal presentaba lesiones en las punturas de las suspensiones más concentradas y en el suero se apreciaba ya la existencia de anticuerpos con los tres antígenos utilizados. (Véanse esquema y resultados); la segunda (cinco días), efectuada estando todas las punturas con lesiones en pleno desarrollo, el suero dio títulos bajos, y en los sueros de las sangrían tercera y cuarta los títulos fueron ya normales. (Véanse esquemas y resultados.)

El conejo correspondiente al suero número 50 fue sangrado a las veinticuatro horas y a los dos, tres y seis días. En la observación del animal, en el momento de la primera sangría (veinticuatro horas), se

apreciaron dos pequeñas lesiones en las punturas de las suspensiones al 1/10 y al 1/100. En el suero no se pudo determinar la existencia de anticuerpos con ninguno de los antígenos; éstos fueron determinados en el de la segunda (dos días), con uno de los antígenos y con más evidencia en el de la tercera (tres días), pero sin pasar de una fijación de uno en la dilución 1/2. El suero de la cuarta y última sangría (seis días) presentó títulos muy bajos. (Véanse esquemas y resultados.)

CONCLUSIONES

1.ª Las pautas de inmunización de los conejos, mediante punturas intradérmicas o escarificación cutánea, proporcionan sueros ricos en anticuerpos fijadores del complemento.

2.ª Las inoculaciones inmediatas y sucesivas por más de una vía no refuerzan la formación de anticuerpos.

3.ª Todos los materiales utilizados dieron lugar a la formación de anticuerpos, incluso los que resultaron negativos al ser inoculados en punturas intradérmicas.

4.ª En general, los conejos que presentaron numerosas y grandes lesiones proporcionan sueros de altos títulos.

5.ª Con muy pocas y pequeñas lesiones pueden obtenerse sueros de buen título.

6.ª Con materiales procedentes de conejos infectados, que al ser inoculados en otros no dieron lugar a lesiones aparentes en las punturas, pueden obtenerse sueros de buen título.

7.ª La iniciación de la formación de anticuerpos es tan precoz, que éstos pueden apreciarse en los sueros correspondientes a las sangrías efectuadas a los tres días de la inoculación e incluso en las de cuarenta y ocho horas, si se dispone de antígenos de gran sensibilidad.

8.ª La plenitud de anticuerpos se presenta en los sueros de los diez a los doce días de la inoculación y se conservó en algunos de nuestros sueros hasta los setenta (suero número 27).

9.ª La persistencia en mayor o menor grado de los anticuerpos en los sueros fue hasta de trescientos cinco días (sueros números 27, 45, 28, 29, 24, 40 y 38).

10. Un reducido número de sueros fueron anticomplementarios (números 6, 19, 15, 21, 22 y 47).

11. Nuestros peores antígenos fueron los obtenidos con materiales avirulentos y pústulas de piel de conejo; los mejores, los de elementos embrionarios de huevos de gallina incubados y los de pulpa vacunal de ternera.

12. Las fijaciones del complemento practicadas con más de un antígeno dan un mayor valor específico a las pruebas.

RESUMEN

En este trabajo fueron obtenidos antígenos muy sensibles y gran número de sueros de conejos inoculados con virus vacunal activo y atenuado de distintas procedencias, estudiándose la presencia de anticuerpos fijadores del complemento.

SUMMARY

We have obtained very sensible antigens and a lot of sera from rabit inoculated with active and attenuated vaccinal virus from various sources. We have also verified the presence of complement fixing antibodies.

BIBLIOGRAFIA.

(1) Jenner, C. Inquiry into the Causae and effects of the variololavaccinae. Londres, 1798.
(2) Sacco, L. Trattato di Vaccinazione. Milano, 1809.
(3) Pearson. Examination of Report to House of Commons on the claims of remuneration for Vaccine pock Inoculation. Londres, 1802.
(4) Hugenin, C. Ergeb. allg. Path. Anat. 4, 246. 1897.
(5) Ricketts, T. F. Diagnosis of Small pox. 1908.
(6) Gordon, M. H. Sp. Rep. Med. Res. Counc. Núm. 98, 1925.
(7) Pirquet, C. von Weiner. Klin. Wochenschr. 19, 1407, 1906.
(8) Thieche. Schweizer. Med. Wochenschr. 1924.
(9) Eckstein, A.; H. Herzeberger, y K. Herzeberger. Deutsche Med. Wochenschr. Núm. 7, 1930.
(10) Ledinghan, J. C. G. Morgan y Petrie. Brit. Journ. exp. Path. 12, 357, 1931.

(11) Levaditi, C., y V. Sanchis Bayarri. S. R. Soc. Biol. 98, 829, 1928.
(12) Gordon, M. H. Sp. Rep. Med. Res. Counc. Núm. 98, 1925.
(13) Levaditi y Nicolau. Ann. Inst. Pasteur. 37, 1, 1923.
(14) Cannes, L. Vaccination on newly born. Bull. Ac. Med. 84, 35, 1920.
(15) Freyer. Das Immunserun der Kuhpockenlymphe Ztbl. Bakt. 90, 109, 1923.
(16) Straus, Chambon y Menard. Recherches experimentales sur la vaccine chez le veau. Sem. Med., 1890.
(17) Urbani. L'invernaciamento degli animale nella produzione del l'immonosiero anti-vaccinico. Pathologica. Núm. 324, 1922.
(18) Gildemeister. Uber Gewinnug Keimfreier Schutzpokenlymphe. Ztbl. Bakt., 90, 109, 1923.
(19) Gordon. M. H. Med. Res. Council, Spec. Rep. Ser. 98, 85, 1925.
(20) Sternberg. Wissenschaftliche Untersuchungen über das spezifische Infektionsagens der Blattern und die Erringung künstlicher Immunitat gegen die Krankheit. Ztbl. Bakt. t. 19, 1896.
(21) Matsuda. Über die Verstärkung der Virulicidie bei der Vacci neimmunität durch unspezifischen Reiz. Ztschr. Imm. Frschg., 41, 1904.
(22) C. Russel. Amiens, Lancet, p. 558, 1932.
(23) Gordon. Med. Res. Council. Special Report, serie 98, 1925.
(24) V. G. Tulloch. Journ. Stat. Med. 42, 683, 1934.
(25) Gastinel, These. París, 1913.
(26) Hasen y Buchbinder. Journ. Immun., 22, 189, 1932.
(27) Parker y Muckenfuss. Proc. Soc. Exp. Biol. Medic., p. 483, janvier 1932.
(28) Finlaysen. Brith. Journal Exp. Path., 26, 358, 1935.
(29) Gallardo, E. Arch. Inst. Alfonso XIII, 1924.
(30) Gallardo, E. y García Gancedo, A. P. Rev. Microbi. Española. Vol. 9, febrero-marzo 1956, núm. 1.
(31) Monteiro y Godinho. Mem. Inst. Butantan. 5, 1930.
(32) Calmette, A. y C. Guerin. Ann. Inst. Pasteur. 15, 161, 1901.
(33) España, C. and Hammon, M. C. D. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 66, 101, 1947.
(34) Cox, H. R. Pub. H. Rep. 53, 2.441, 1938.
(35) Casals, J. and Palacios, R. Jour. Exp. Med. 74, 409, 1941.
(36) Casals, J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 339, 1949.
(37) Bedson, S. P., y Bland, J. O. W. Ibid. t. 10, p. 393, 1929.
(38) Craigie, J., y Tulloch, W. J. Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun., núm. 156. Londres, 1931.
(39) Groth, A. Ergeb. Hyg. Bakt., 10, 335, 1929.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

UN NUEVO *STREPTOMYCES* CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFUNGICAS

POR

RAFAEL JORDA, MIGUEL LOPEZ y BENITO REGUEIRO

Salvo escasas excepciones, la mayoría de los antibióticos hoy día conocidos proceden de microorganismos originariamente aislados del suelo. Los microorganismos viven en el suelo en poblaciones heterogéneas y en multiplicidad de interrelaciones, una de las cuales es la de antagonismo, como estudia Burkholder (1952).

El aislamiento de microorganismos antagonistas, de acción específica a partir del suelo, presenta serias dificultades, como observan Routien & Finlay (1952), aunque el éxito depende sobre todo de factores no técnicos, como la probabilidad y el azar. Los microorganismos que producen antibióticos se agrupan en bacterias, actinomyces y hongos, siendo el segundo grupo el que se muestra más prometedor en cuanto a la producción de sustancias antibióticas. Estas también pueden agruparse, según los seres sobre los que actúan, en activas contra: virus, bacterias, hongos, protozoos y tumores.

Nosotros hemos concretado nuestro trabajo a la busca de *Streptomyces* con posible actividad contra hongos saprófitos y patógenos, campo en el que hasta la fecha los resultados no han sido muy halagadores.

Hay que señalar que el encuentro de un germen con propiedades antagonistas no da por finalizado el trabajo. Burkholder (1946) encuentra que del 15-60 % de las razas por él aisladas poseen propiedades antimicrobianas, sin que por esto sean apropiadas para producir antibióticos utilizables. Ahora bien, la primera fase de un trabajo de esta naturaleza es: el aislamiento de microorganismos, la comprobación de su actividad antagonista, y en caso de ser prometedor, su clasificación. Esta es la finalidad del presente trabajo.

AISLAMIENTO DE *STREPTOMYCES*

Aunque son numerosos los trabajos que estudian nuevas razas de *Streptomyces* aisladas del suelo, pocos son los que describen en detalle las técnicas empleadas en dicho aislamiento. Entre éstos debemos señalar, por su interés, un trabajo de Janot y col. (1954) y otro de Ball y col. (1957). Los primeros estudian muestras de tierra de diferentes países, aislan 7.941 cultivos, pero sólo prueban su actividad contra *Staphilococcus aureus* y *Salmonella pullorum*. Los segundos aislan 60 cultivos de *Streptomyces* a partir de 25 muestras de tierra y estudian antibióticos de tipo polieno, es decir, activos contra hongos, pero no contra bacterías. Una revisión interesante sobre esto es la de Pérez Ureña (1957).

Cuando se realiza el aislamiento de microorganismos del suelo, es conveniente el conocimiento de diversos factores físicos, químicos y biológicos del mismo y que pueden tener relación con la vida del microorganismo. Una determinada serie de condiciones ambientales permite el desarrollo de determinadas especies de microorganismos. En nuestro caso realizamos el aislamiento de *Streptomyces* en suelos apropiados para su crecimiento.

Técnica de aislamiento de Streptomyces.

Las muestras de tierras son enviadas por el profesor Muñoz Taboadela, del Laboratorio de Geología, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago, a quien agradecemos su colaboración. Dichas muestras se toman a profundidades de 20-30 cm. y se recogen en frascos estériles de boca ancha. Se toma nota de: origen de la muestra, flora vegetal, clima, época de la toma de muestra, clase de terreno, pH, fecha y localidad. De esta forma y con estos datos se envían al laboratorio para su estudio.

Se hace una suspensión de un gr. de tierra en 10 c. c. de agua estéril, agitando bien; un c. c. de esta suspensión se añade a otros 10 c. c. de agua estéril y 5 c. c. de esta dilución se añaden a 100 c. c. del medio de aislamiento (A):

Glicerina	1,2 %
Nitrato amónico	0,1 %
Fosfato dipotásico	0,1 %
Agar-agar	2,0 %

pH = 8.0

La adición de la suspensión de microorganismos del suelo se hace sobre el medio fundido, éste se reparte a continuación en placas, se deja enfriar y se incuba a 25° durante cuatro días. Según el número de colonias que aparecen se hacen mayores o menores diluciones.

Estudio y observación macroscópica y microscópica de las colonias, muestran la presencia de *Streptomyces típicos*. Con aguja estéril se siembran éstas en tubos inclinados con medio Emerson, donde se dejan esporular a 25° durante siete dias. De esta forma y a partir de tres muestras de suelos diferentes, hemos logrado aislar 250 cultivos de *Streptomyces*.

Técnica de prueba de antagonismo.

A continuación y con cada uno de los cultivos aislados, se realiza la prueba de antagonismo contra diferentes microorganismos representativos de especies. El medio que utilizamos es el siguiente (B):

Glucosa	1,0 %
Peptona	0,5 %
Extracto de carne	0,3 %
Cloruro sódico	0,5 %
Agar-agar	2,5 %

pH = 7.0

Este medio se reparte en placas y se deja solidificar. Por su diámetro máximo se siembra una suspensión de esporas del *Streptomyces* a estudiar y se deja a 25° por siete días. A continuación y perpendicularmente se siembran los gérmenes de prueba y se dejan a 30° durante cuatro días. Se toma nota de la presencia o ausencia de inhibición, así como del tamaño de la misma.

Probados, de la manera anterior, los 250 cultivos de *Streptomyces* aislados, fijamos la atención en el más activo de todos ellos, procedente de un suelo de Zamora y aislado el 10 de febrero de 1958, con número de registro Z-81. Los resultados que da en la prueba de antagonismo, son los siguientes:

Staphilococcus aureus	Inhibición total.
Bacillus subtilis	Inhibición total.
Sarcina lutea	Inhibición total.
Candida albicans	Inhibición total.
Alternaria sp.	Inhibición total.
Aspergillus niger	Inhibición casi total.
Trichophytum mentagrophytes	Inhibición de 34 mm.
Microsporum sp.	Inhibición de 15 mm.
Scopulariopsis sp.	Inhibición de 10 mm.
Trichosporum sp.	Inhibición de 18 mm.
Aspergillus flavus	Inhibición de 12 mm.
Fusarium sp.	Inhibición de 25 mm.

Como se observa, la actividad antibacteriana y antifúngica de este *Streptomyces* es muy fuerte, y antes de comenzar a estudiar el aislamiento y purificación del antibiótico producido, realizamos su clasificación, para conocer si nos hallamos en presencia de una nueva raza de *Streptomyces*.

CLASIFICACION DEL *STREPTOMYCES* Z-81.

Aunque la taxonomia del género *Streptomyces* fue muy estudiada, todavía hoy no existe una clasificación verdadera, debido a la variedad y complejidad de especies de este género y a la falta de caracteres realmente diferenciales. Hesseltine y col. (1954) afirman que la confusión en el estado de la taxonomia de este género se debe a múltiples causas: errores en bibliografía, falta de uniformidad descriptiva, complejidad de medios, etcétera, etc.

Los autores anteriores, así como Waksman & Lechevallier (1953), proponen una clasificación fundada en producción de micelio aéreo y vegetativo, producción de pigmentos y actividad bioquímica en diferentes medios. La clasificación de los últimos autores es la incluída en el Bergey's (1957).

Pridham y col. (1956-1957) describen diecinueve medios de cultivo para clasificación de *Streptomyces*, en forma estandardizada. Algunos autores, como Pridham & Gottlied (1948) y Benedict y col. (1955), utilizan las respuestas del crecimiento del *Streptomyces* en presencia de diferentes fuentes de carbono.

Waksman (1957) hace un estudio crítico muy completo sobre el género *Streptomyces* desde el punto de vista taxonómico y de especie. Los caracteres que tiene en cuenta son los siguientes: morfológicos (micelio aéreo, micelio vegetativo, colonias, reacciones de coloración) y propiedades de cultivo y bioquímicas (formación de pigmentos, utilización de fuentes de carbono, utilización de compuestos nitrogenados, producción de compuestos químicos específicos y efecto de fagos). Estos caracteres se pueden completar con los siguientes: reacciones serológicas, composición química, condiciones ecológicas y relaciones genéticas.

Es también de gran interés en la taxonomia del género *Streptomyces*, el trabajo de Pridham y col. (1958), que afirman que aunque cada vez aparecen más especies nuevas de *Streptomyces*, éstas no son sino variedades de las ya existentes. Dan una clasificación fundada en la morfología de los esporoforos y color del micelio aéreo.

Pruebas de clasificación realizadas.

Se realizan una serie de pruebas morfológicas, de cultivo y bioquímicas, que reseñamos a continuación:

1.° En diferentes medios se realiza observación microscópica (400 aumentos) y se ven esporoforos rectos o ligeramente ondulados y poco ramificados; no se observan espirales. Colocando un cubreobjeto y observando por inmersión, se ven cadenas de esporas rectas o ligeramente onduladas y de forma esférica a oval.

2.° En las pruebas de cultivo realizadas, se reseña el color del mice-

lio aéreo, micelio vegetativo y pigmento soluble, como se indica a continuación:

MEDIO DE CULTIVO	Micelio aéreo	Micelio vegetativo	Pigmento soluble
Medio (A)	Blanco amarillo.	Muy amarillo.	Amarillo.
Medio EMERSON... ...	Amarillo.	Barniz madera.	Amarillo fuerte.
Medio (B)	Amarillo.	Marrón.	Amarillo.
Agar-CZAPEK.	Blanco.	Amarillo.	Amarillo.
Glucosa - asparragina - agar...	Blanco.	Amarillo.	Carece.
Agar-malato Ca.	Amarillo limón.	Amarillo.	Amarillo.
Agar-tirosina	Amarillento.	Amarillento.	Carece.
Agar-caldo-peptona. ...	Amarillo claro.	Amarillo oro.	Amarillo.
Agar-caldo-glicerina ...	Blanco amarillo.	Amarillo.	Carece.
Agar-almidón	Amarillo claro.	Amarillo naranja	Amarillo.
Patata.	Blanco amarillo.	No se ve.	Carece.
Zanahoria.	Blanco amarillo.	No se ve.	Verde claro.
Agar-huevo...	Blanco amarillo.	Blanco amarillo.	Carece.
Agar-extracto levadura.	Blanco marfil.	Canela.	Carece.
Celulosa	Amarillo verdoso	Amarillo verdoso	Carece.
Agar-sangre...	Blanco marfil.	Oscuro.	Carece.
Agar-LOEFFLER.. ...	Amarillo.	Amarillo.	Carece.

3.° Entre las pruebas bioquímicas realizadas, se obtienen los resultados siguientes:

Agar-almidón ... ... no hidrólisis.
Celulosa.. ... ... no hidrólisis.
Sangre ... ... hidrólisis.
Leche ... ... coagula, forma anillo amarillo.
Nitratos. ... ... reduce.
Gelatina. ... ... se liquida.

También se realizan pruebas de utilización de azúcares, según el método de Pridham & Gottlied (1948), dando los resultados siguientes:

AZUCAR	UTILIZACION	PIGMENTO
Inulina..	Parcial.	—
Manosa.	Parcial.	+
Xilosa...	Parcial.	+
Sorbitol.	Parcial.	+
Arabinosa...	Positiva.	+
Celobiosa...	Positiva.	+
Sacarosa	Parcial.	—
Manitol.	Positiva.	+
Ramnosa...	Positiva.	+
Levulosa	Positiva.	+
Maltosa.	Positiva.	+
Galactosa...	Positiva.	+
Rafinosa	Parcial.	—
Inosita..	Parcial.	—
Lactosa.	Parcial.	—
Glucosa.	Positiva.	+
Glicerina	Positiva.	+

RELACIONES TAXONOMICAS

A la vista de los resultados anteriores de identificación del *Streptomyces* por nosotros aislado, trataremos ahora de situarlo dentro de las clasificaciones más utilizadas actualmente.

Por la clasificación de Waksman & Henrici (1953) o la misma, que es la que incluye el Bergey's 7.ª (1957), nos encontramos con un *Streptomyces* saprófito, mesófilo, con pigmento amarillo en medio orgánico, que no descompone la celulosa, liquida la gelatina, micelio aéreo amarillo. Por estas razones podría ser el *Streptomyces parvus*. No puede incluirse dentro del grupo *Streptomyces flavus* de pigmento amarillo, por no poseer micelio aéreo blanco, ni tener esporóforos espirales.

Por la clasificación de Krassilnikov (1941), nos encontramos con un *Streptomyces* con esporóforos rectos a ondulados, con pigmento amarillo naranja, lo que podría ser el *Streptomyces longissimus.*

Por la clasificación de Pridham y col. (1958), nos encontramos con un *Streptomyces* de la sección I (*rectus-flexibilis*), con esporóforos rectos y no espirales; dentro de esta sección se puede incluir en la "serie" amarilla, que incluye los siguientes: *St. albo-flavus, St. globisporus-flaveolus, St. griseoflavus, St. parvus, St. flavus, St. longissimus* y otros menos conocidos,

De todas las especies mencionadas que se pueden relacionar taxonómicamente con la encontrada por nosotros, podemos eliminar al *St. globisporus-flaveolus,* por pertenecer al grupo de *St. albus,* que presenta micelio blanco, y a los siguientes: *St. flavus, St. griseoflavus* y *St. albo-flavus,* por pertenecer al grupo del *St. flavus,* que como indicamos anteriormente poseen micelio blanco y tienen esporóforos espirales.

Con esto solamente quedan, parecidos, el *St. parvus,* el cual presenta esporóforos en espiral e hidroliza el almidón, aparte otros caracteres diferentes y el *St. longissimus,* que no da pigmento soluble en el medio e hidroliza el almidón, aparte otros caracteres diferentes.

CONCLUSION

A la vista de las pruebas de identificación morfológica, de cultivo y bioquímicas, de la raza *Streptomyces* Z-81, aislada en nuestro laboratorio y teniendo en cuenta los caracteres que la diferencian de razas ya conocidas y el no haber encontrado en la literatura descripciones de razas parecidas, nos permite concluir que nos encontramos ante una nueva raza de *Streptomyces* de gran actividad antibacteriana y antifúngica, que actualmente se estudia para la producción y purificación del antibiótico correspondiente.

SUMMARY

At the sight of the morphological, culture and biochemical identification tests of the breed *Streptomyces* Z-81 isolated in our laboratory and having account of the characters that make it different from other breeds

already known, and having found in the literature no descriptions of similar breeds, we can conclude that we have here another breed of *Streptomyces* of great anti-bacterian and anti-fungic activity which is now being studied for the production and purification of its corresponding antibiotic.

BIBLIOGRAFIA

S. Ball, C. J. Bessell, A. Mortimer. 1957. The production of polyenic antibiotics by soil streptomyces. J. Gen. Microbiol. 17 : 96.

R. G. Benedict, T. G. Pridham, L. A. Lindenfelser, H. H. Hall, R. W. Jackson. 1955. Further studies in the evaluation of carbohydrate utilization test as aids in the differentiation of species of streptomyces. Appl. Microbiol. 31 : 1.

P. R. Burkholder. 1946. Studies on the antibiotic activity of actinomycetales. J. Bacteriol. 52 : 503.

P. R. Burkholder. 1952. Cooperative and conflict among primitive organisms. Amer. Sc. 40 : 601.

R. S. Breed, E. G. Murray, A. P. Hitchens. 1957. Bergey's Manual od determinative Bacteriology. 7.ª ed. Williams & Wilkins Co.

C. W. Hesseltine, R. G. Benedict, T. G. Pridham. 1954. Useful criteria for species diferentiation in the generus streptomyces. Ann. N. Y. Acad. Sc. 60 : 136

M. M. Janot, H. Penau, G. Hagemann, H. Velu, J. Teillon, G. Bouet. 1954. Recherche de souches nouvelles de streptomyces antibiotiques. Ann. Pharm. Francaises. XII : 440.

Krassilnikov. 1941. The guide to the ray fungy : Actinomycetales.

M. T. Pérez Ureña. 1957. Los antibióticos antifúngicos. Medicamenta. XVII : 13.

T. G. Pridham, P. Anderson, G. Foley, L. A. Lindenfelser, C. W. Hesseltine, R. G. Benedict. A selection of medio for maintenance and taxonomic study of streptomyces. Antibiotic Ann. 947. 1956-57.

T. G. Pridham, D. Gottlied. The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as aid for species determination. J. Bacteriol. 56 : 107. 1948.

T. G. Pridham, C. W. Hesseltine, R. G. Benedict. 1958. A guide for the clasification of streptomyces according to select groups. Appl. Microbiol. 6 : 52.

J. B. Routien, A. C. Finlay. 1952. Problems in the search for microorganisms producing antibiotics. Bact. Rews. 16 : 51.

S. A. Waksman, H. A. Lechevallier. 1953. Actinomycetes and their antibiotics. Willians & Wilkins Co.

S. A. Waksman. 1957. Species concept among the actinomyces with special reference to the generus streptomycetes. Bact. Rews. 21 : 1.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR FERMENTACION

II. Influencia de los iones metálicos en la fermentación en superficie.

POR

José Luis MALO ECHEVARRIA y Benito REGUEIRO VARELA

INTRODUCCION

En un trabajo anterior, Malo & Regueiro (1957) estudian varios factores que intervienen en la producción de ácido cítrico por fermentación de un medio sintético por el *Aspergillus niger*.

Los factores estudiados se relacionaban: con el aislamiento por selección natural y radiación ultravioleta de mutantes que se adaptaran mejor a nuestras condiciones de fermentación. Se estudiaban, a su vez, diversos factores que podían influir sobre la vitalidad de las esporas y en relación con el medio de esporulación. Y por último, se fijaban las condiciones óptimas de algunos factores físicos que podían influir en la fermentación por superficie.

Al tratar del medio de fermentación sintético, decíamos que éste se componía de: un azúcar, sales inorgánicas e iones metálicos, que podían variar según la raza de hongo utilizada.

Como nosotros empleamos un mutante original, se hace preciso el conocer sus necesidades nutritivas, sobre todo en lo relativo a los iones metálicos, y éste es el objeto del presente trabajo.

REVISION BIBLIOGRAFICA

El "medio basal" para la producción de ácido cítrico por fermentación, se compone de azúcar y sales inorgánicas (en nuestro caso: sacarosa, nitrato amónico, fosfato monopotásico y sulfato magnésico). Para lograr un óptimo de producción, hay que añadir a este medio ciertos elementos metálicos.

La adición de uno de estos metales se hace en cantidad pequeñísima, por lo cual se les ha llamado también "elementos traza". Normalmente no se suele fijar la atención en la existencia de estos iones metálicos a no ser que exista un interés bioquímico o fisiológico, y esto se debe a que dichos iones suelen ir "contaminando" los materiales y materias primas que se utilizan en los medios de fermentación.

Cuando se realizan estudios en medios sintéticos, interesa el estudiar el efecto de estos metales, que puede ser: producir una acción beneficiosa, dar lugar a una acción perjudicial o no producir ningún efecto. Estas acciones dependen en gran manera de la raza de hongo que se utiliza y de las condiciones de fermentación.

Como es lógico, cuando se trata de estudiar la influencia de los "elementos traza", lo primero que hay que hacer es privar de dichos iones metálicos a todos los materiales o productos que se utilicen en la prueba. Para esto existen numerosas técnicas que pueden revisarse en el trabajo de Donald & Passey & Swaby (1952), que prueban hasta treinta y ocho métodos de separación de iones metálicos de medios de fermentación. Estos métodos son de dos tipos: adsorción y quelación; el mejor de los primeros es el que utiliza alúmina y de los segundos, el que emplea ditizona y oxina como agentes quelantes. Chesters & Rolinson (1951), utilizan este último método en sus trabajos sobre fermentación cítrica.

La oxina (8-hidroxiquilina) tiene el inconveniente de ser fungistática, como demostró Block (1955) y nosotros mismos (1958).

Quizás el autor que más trabajó en "elementos traza" fue el fisiólogo vegetal americano R. A. Steinberg, que de 1919 a 1939 realizó innumerables trabajos sobre esta cuestión, estableciendo la diferencia entre sustancias "químicamente puras" y "biológicamente puras".

Los iones metálicos pueden influir de muy diversos modos sobre la biología de los hongos: caracteres morfológicos y de cultivo, esporulación, pigmentación vegetativa, actividad fisiológica y bioquímica.

Entre los trabajos realizados sobre la influencia de los iones metálicos en la producción de ácido cítrico por fermentación de un medio sintético por el *Aspergillus niger* en superficie, hemos selecionado los siguientes:

Xandri & Hidalgo (1954), siguiendo trabajos comenzados por Marcilla, estudian la influencia del zinc en la fermentación cítrica, encontrando que la cantidad óptima del sulfato de este metal es de un 0,1 %, dosis superiores a un 0,1 %, inhiben el desarrollo de la raza por ellos utilizada en medio Stark. El mayor rendimiento que obtuvieron fué de un 25,21 % de conversión.

El zinc tiene una gran influencia en el metabolismo de los azúcares, siendo también estudiado por Chesters & Rolinson (1951), que encuentran que con poco zinc hay una mayor conversión del azúcar a ácido cítrico, afectando a lo que se llama "coeficiente económico" del hongo (peso micelio / azúcar utilizado), pues, cuanto más ácido, el crecimiento del hongo es menor.

Bertrand & Wolf (1956) estudian el efecto del cobre en la fermentación cítrica y afirman que la carencia de este elemento reduce un 50 % el peso de micelio y evita la esporulación; al añadir cobre aumentan peso y esporulación. Parece que este metal interviene en la síntesis de ácido cítrico y en su utilización en el ciclo de Krebs.

Un trabajo que tiene interés en relación con lo anterior, es el de Perlman & Dorrell & Johnson (1946), que parte de la afirmación de que el contenido metálico del medio de fermentación disminuye el rendimiento en ácido cítrico. Estudiando el efecto de iones aislados o en mezclas, en medios con agua destilada, no observan grandes variaciones con la raza por ellos utilizada y que además la concentración óptima de metales varía según la raza.

También es interesante el trabajo de Tomlinson & Campbell & Trussell (1951), que es continuación de otro de los mismos autores (1950), en que estudian la influencia de los iones zinc, cobre, hierro, manganeso.

Diferentes autores han confirmado la necesidad de dichos cuatro iones para el crecimiento del *Aspergillus niger* y, por lo tanto, para la producción de ácido cítrico; sin embargo, los resultados que obtienen son muy variables.

Tomlinson & Campbell & Trussell (1951) estudian la influencia de dichos metales sobre producción de ácido cítrico, utilización de azúcar y producción de micelio.

Usan la raza de *A. niger* 72-4 y en el medio basal, preparado con: sacarosa, nitrato sódico, fosfato dipotásico, sulfato magnésico y agua destilada, añaden los metales anteriormente citados en cantidades que oscilan entre 0,1 y 0,05 mgrs. por 100 c. c. de medio.

En los resultados, cualquiera de las combinaciones que no incluyen zinc, rebaja los rendimientos. Resumiendo, afirman que el zinc y el hierro son necesarios para una elevada producción de ácido cítrico, mientras que el cobre y manganeso no presentan pruebas definitivas de esta acción. Una excesiva cantidad de cualquiera de los anteriores elementos interfiere con la producción de ácido cítrico. En general la cantidad óptima de los metales, para una producción elevada de ácido cítrico es más baja que la necesaria para su crecimiento.

METODOS

Como decíamos en trabajo anterior, los métodos utilizados en la producción de ácido cítrico por superficie, puede incluirse en dos apartados: uno en el relativo al microorganismo y los medios y técnicas de fermentación; otro, el relacionado con la toma de muestras y análisis a realizar en las mismas.

Empleamos el *Aspergillus niger* 72-4 Wis. (13), aislado por selección natural, en trabajo anterior. Métodos de conservación, medios de esporulación y fermentación y técnica de fermentación son los mismos que los empleados en trabajo anterior.

La toma de muestras también se realiza de la misma forma, y las determinaciones que se realizan son las siguientes: pH, con aparato Beckman G; azúcar remanente, por el método de Shaffer & Somogyi (1933); acidez titulable, por el método de Karow & Waksman (1947); ácido cítrico, por el método de Perlman & Lardy & Johnson (1944); separación de iones metálicos, por el método de Chesters & Rolinson (1951); el zinc, por el método de la difeniltiocarbazona; el hierro, por el α, α' dipiridiolo; el cobre, por la fenoltaleína alcalina, y el manganeso, por el peryodato, según indican Snell & Snell (1954); el peso de micelio se hace por desecación a peso constante.

Las características morfológicas son las indicadas en el trabajo anterior.

RESULTADOS

1. *Determinación de iones metálicos en el medio de fermentación.*

Antes de comenzar a estudiar la influencia que ejercen algunos iones metálicos sobre la producción de ácido cítrico por fermentación causada por el *Aspergillus niger* en un medio sintético, se hace necesario el conocer el contenido en estos metales de los diferentes componentes del medio.

Para ver la cantidad de estos iones metálicos en *agua corriente,* se concentra una cantidad de ésta unas cuarenta veces, y si se trata de *agua destilada,* unas cien veces; en estos concentrados se hacen las determinaciones.

En la *sacarosa,* así como en las *sales inorgánicas,* se determina zinc, cobre e hierro, en una solución (± 0,250 gr. / c. c.) de cada una; si se trata del manganeso, hay que hacerlo a partir de cenizas.

Los resultados que hemos obtenido son los siguientes:

	Zinc	Cobre	Hierro	Manganeso
Agua corriente (γ/l) . . .	790 - 810	0,10 - 0,25	60 - 70	100 - 125
Agua destilada (γ/l) . . .	0,5 - 1,0	0,05 - 0,10	0,5 - 1,0	5 - 10
Sacarosa (γ/100 gr.). . . .	265 - 300	16 - 20	170 - 270	230 - 310
NO_3NH_4 (γ/100 gr.). . .	—	—	200	—
SO_4Mg (γ/100 gr.) . . .	500	—	10	50
PO_4HK (γ/100 gr.)	—	—	—	—

Debido a la pequeña cantidad de sales inorgánicas que se emplean en el medio de fermentación, la cantidad de iones metálicos que adicionan al medio es inapreciable en el mismo.

Es decir que, en realidad, solamente el agua corriente o el azúcar pueden influir en cuanto a su contenido en iones metálicos, y esto en parte lo veremos en apartados posteriores.

2. Adición de iones metálicos a medio con agua corriente y destilada.

Teniendo en cuenta la experiencia anterior, se trata de ver la influencia que el tipo de agua (corriente o destilada) puede ejercer en la producción de ácido cítrico por fermentación, así como las posibles variaciones por adición de cada uno de los principales iones metálicos (gammas/100 centímetros cúbicos de medio); según el cuadro siguiente:

Matraces números	Zinc	Cobre	Hierro	Manganeso
1 — a	—	—	—	—
2 — b	25	—	—	—
3 — c	—	6	—	—
4 — d	—	—	130	—
5 — e	—	—	—	10
6 — f	25	6	130	10

Los números corresponden al agua corriente, y las letras a los matraces de agua destilada. Los resultados son los siguientes:

Matraz	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	Conversión
1	1.8	2,990 gr.	3,10 %	3,333 gr.	23,8 %
2	1.8	3,010 "	3,40 %	2,989 "	21,3 %
3	1,8	2,850 "	4,30 %	2,433 "	17,3 %
4	1.8	2,999 "	2,10 %	3,783 "	27,9 %
5	1.8	3,040 "	3,10 %	3,307 "	23,6 %
6	1.9	2,670 "	3,40 %	2,757 "	19,6 %
a	1.9	1,970 "	6,30 %	3,260 "	23,2 %
b	1.7	2,300 "	2,60 %	5.346 "	38,1 %
c	2.0	1,770 "	7,00 %	2,320 "	16,5 %
d	2.2	1,840 "	3,70 %	2,637 "	18,8 %
e	2.0	2,055 "	7,30 %	1,277 "	9,1 %
f	2.0	2,165 "	3,80 %	1,694 "	12,1 %

Los medios que llevan agua destilada crecen antes, y al segundo día todos estos matraces presentan crecimiento abundante y esporulación, a excepción hecha del (d); además, presentan todos pigmentación, a excepción a su vez de los matraces (d) y (f).

Los matraces que llevan agua corriente, al tercer día los (1) y (2) presentan la superficie blanca sin pigmentar, el (3) se presenta esporulado y pigmentado, el (4) sin esporular, ni pigmentar y el (5) y (6) esporulados, pero poco pigmentados.

En general, el empleo de agua corriente, en la producción de ácido cítrico por fermentación, da una mayor producción de micelio, un mayor consumo de azúcar y una mayor producción de ácido cítrico. Existe una excepción, y es cuando al agua destilada se añade zinc.

Cuando se añaden metales al agua corriente, se observa que aquéllos no influyen apreciablemente en la cantidad de micelio, aunque la adición de cobre produce una aceleración de la esporulación y producción de pigmento. En la utilización o consumo de azúcar, el cobre retarda ésta y en cambio el hierro la acelera. En producción de ácido cítrico, el cobre la disminuye y el hierro la aumenta. Los demás metales influyen poco.

Cuando se añaden metales al agua destilada, se observa que únicamente el cobre influye aumentando cantidad de micelio. La presencia de hierro evita la esporulación y la pigmentación. La utilización de azúcar la aumentan el hierro y el zinc y la producción de ácido cítrico únicamente la presencia de zinc la aumenta considerablemente, al contrario de los demás metales, que la disminuyen.

3. *Influencia de los componentes del agua corriente en la fermentación.*

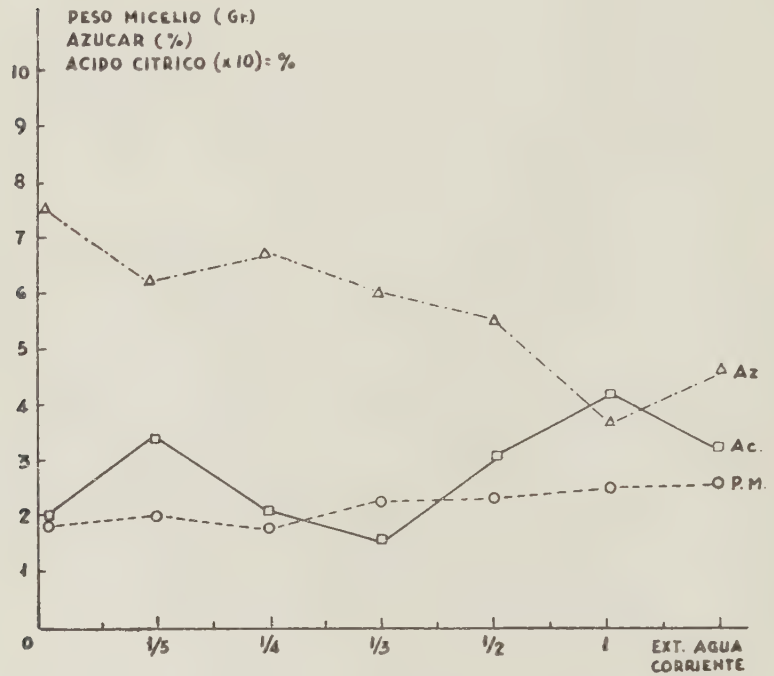
Habiendo observado que la fermentación realizada en médio con agua corriente va mejor que la realizada en agua destilada, tratamos ahora de ver la posible acción de los componentes de dicha agua, para lo cual concentramos una cantidad de la misma al 1/20 y añadimos diferentes cantidades a un medio preparado con agua destilada, de forma que los componentes del agua corriente están a 1/5, 1/4, 1/3, 1/2, 1/1, utilizando, además, controles con agua destilada y agua corriente.

Con los resultados obtenidos, se construye la gráfica núm. 1.

Con relación a las características externas, a los dos días, se observa

crecimiento superficial en todos los matraces, pero mayor a medida que aumenta la cantidad de extracto de agua corriente. Después del tercer día, no se observan diferencias entre los matraces, que se presentan todos esporulados, hasta el décimo día en que se realizan los análisis.

Los componentes que existen en el agua corriente no afectan a la



Gráfica 1.

producción de micelio; en cambio aumentan la velocidad de utilización del azúcar así como la producción de ácido cítrico.

4. *Influencia de la adición de iones metálicos al agua destilada.*

Para fijar más la influencia de los iones metálicos en la producción de ácido cítrico, se realiza una experiencia en que se utiliza agua destilada con diferentes cantidades de metales, según se indica en los resultados

de las gráficas nums. 2, 3, 4 y 5. Observando estas gráficas, se pueden derivar las conclusiones siguientes en cada caso:

Un aumento en la cantidad de *zinc,* produce aumento en la producción de micelio, en la utilización de azúcar, así como en la formación de ácido cítrico.

Un aumento en la cantidad de *cobre,* no afecta a ninguno de los tres factores: producción de micelio, utilización de azúcar y formación de ácido cítrico. Lo mismo puede decirse cuando se trata de la adición de *hierro* y *manganeso.*

5. *Tratamiento del medio basal por oxina.*

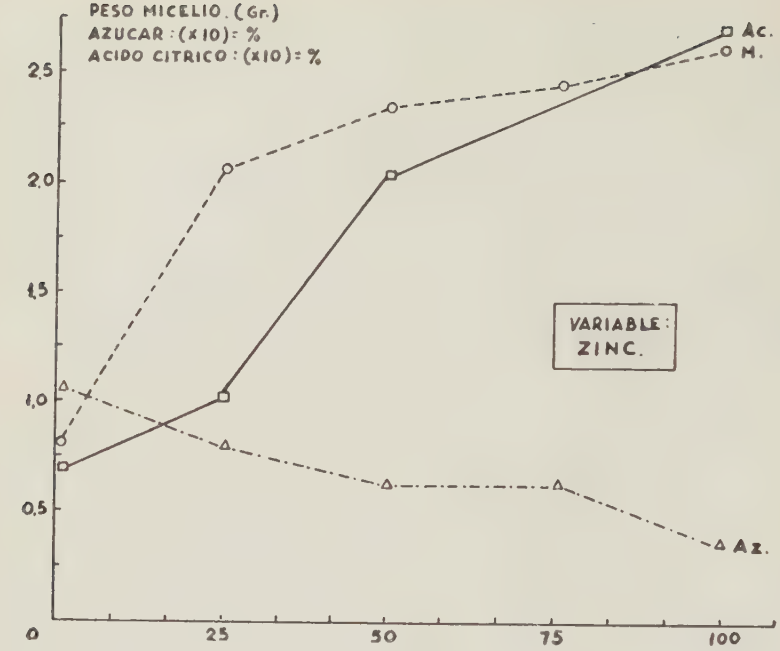
Sobre el efecto de la 8-hidroxiquinolina (oxina) en complejar iones metálicos y el método de su empleo en fermentaciones, ya se habló en otra parte. Aquí se trata ahora de ver el efecto de este tratamiento en el medio basal (sin azúcar), con la subsiguiente adición de los metales.

Los matraces preparados con el medio basal tratado, llevan: (1) sin metales; (2) 25 γ zinc; (3) 6 γ cobre; (4) 130 γ hierro; (5) 10 γ manganeso; (6) las mismas cantidades de cada uno de los cuatro metales. Los resultados son los siguientes:

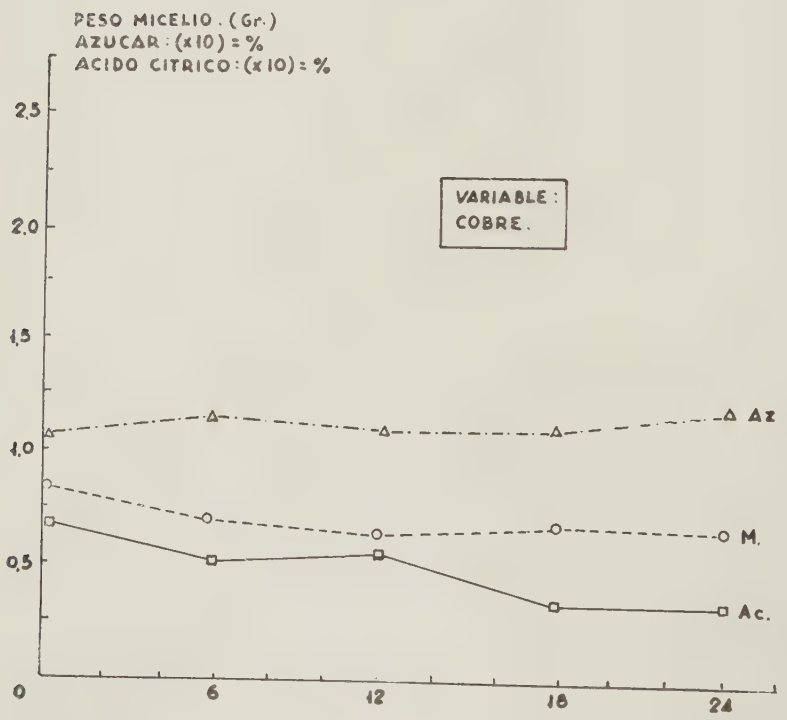
Matraz	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	Conversión
1	2.2	—	11,30 %	0,820 gr.	5,9 %
2	1.9	—	7,80 %	1,428 "	10,1 %
3	2.3	—	10,10 %	0,872 "	6,2 %
4	2.1	—	9,20 %	1,005 "	7,1 %
5	2.1	—	9,60 %	0,872 "	6,2 %
6	2.2	—	5.50 %	1,031 "	7,3 %

En relación con las características morfológicas externas, se encuentra que al tercer día, el crecimiento en todos los matraces es parecido, pero la pigmentación es diferente en cada caso:

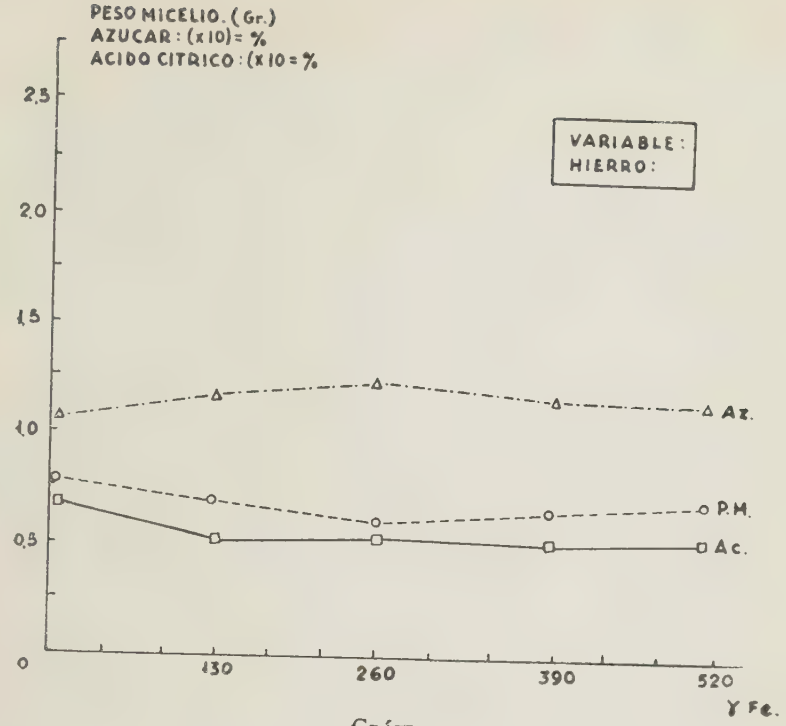
(1) y (5) pigmentación de esporas es castaño-verdosa; (2) tiene un tono gris-verdoso claro; (4) es gris-verdoso oscuro, y en (3) y (6) es pardo intenso.



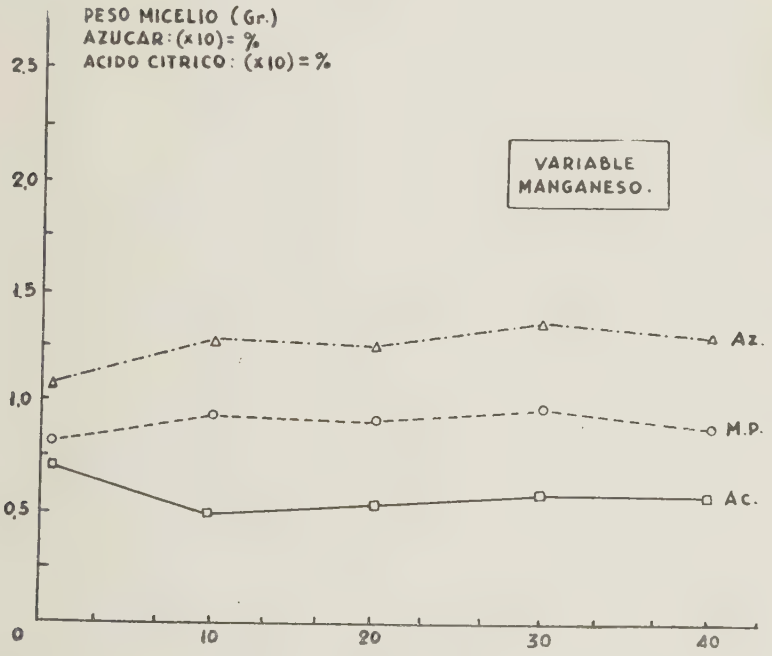
Gráfica 2.



Gráfica 3.



Gráfica 4.

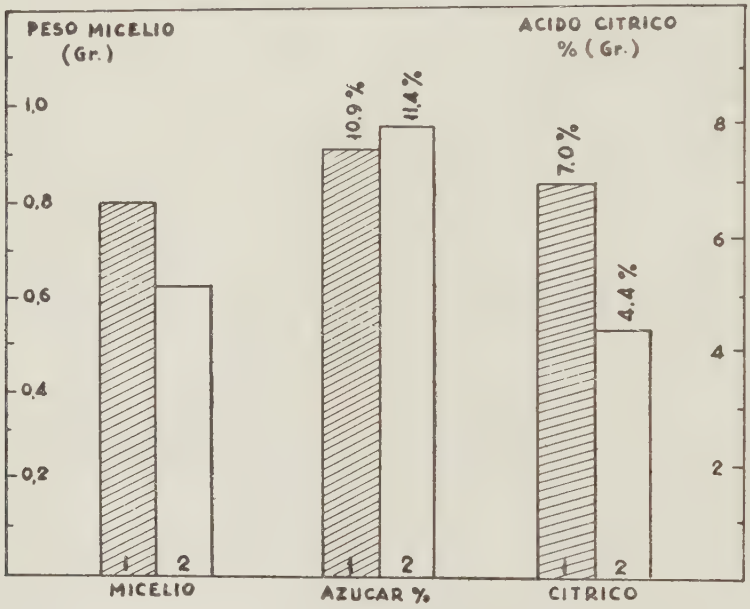


Gráfica 5.

Resumiendo, encontramos que el tratamiento por oxina y posterior adición de iones metálicos, produce diferencias de pigmentación. En todos los casos el consumo de azúcar es muy bajo y únicamente la adición de los cuatro metales lo hace subir un poco. La formación de ácido cítrico es un poco superior al control, sobre todo en el caso de adición de zinc.

6. *Tratamiento del azúcar por oxina.*

Se prepara una solución de sacarosa, se trata por la oxina y después se añaden las sales minerales. Se preparan dos series de matraces, unos sin y otros con tratamiento. El resultado puede verse en la gráfica núm. 6.



Gráfica 6.

Se observa que el tratamiento del azúcar por oxina produce una disminución de micelio, baja la utilización de azúcar, aunque muy poco y mucho la producción de ácido cítrico.

7. Tratamientos de diferentes medios por oxina.

Se trata aquí de ver qué influencia puede tener el tratamiento por oxina de diferentes aguas y medios basales, para averiguar las causas de las diferencias. El cuadro de variables es el siguiente:

1 = Medio con agua corriente (control).
2 = Medio con agua destilada (control).
3 = Medio con agua corriente, tratado por oxina.
4 = Medio con agua destilada, tratado por oxina.
5 = Medio con agua corriente, tratado por oxina, adiciona magnesio.
6 = Medio con agua destilada, tratado por oxina, adiciona magnesio.
7 = Agua corriente tratada por oxina.
8 = Agua destilada tratada por oxina.

Los resultados obtenidos, con las variables anteriores, son los siguientes:

Matraz	pH	Peso micelio	Azúcar remanente	Cítrico/100 medio	Conversión
1	1.6	2,800 gr.	9,75 %	2,033 gr.	14,5 %
2	2.2	1,830 "	7,00 %	0,625 "	4,4 %
3	1.7	0,390 "	4,50 %	1,277 "	9,0 %
4	1.8	0,575 "	5,15 %	1,251 "	8,9 %
5	1.6	2,050 "	6,10 %	1,225 "	8,7 %
6	1.6	1,155 "	4,90 %	1,028 "	7,6 %
7	1.7	1,490 "	5,45 %	1,851 "	13,1 %
8	1.7	1,635 "	4,05 %	0,787 "	5,6 %

En todos los casos, siempre el empleo de agua corriente da resultados superiores al agua destilada tratada, en cuanto a producción de ácido cítrico.

Los medios basales tratados por oxina dan menor cantidad de micelio; la utilización de azúcar, en cambio, es mayor. En cuanto a la producción de ácido cítrico, es menor en cuanto se usa agua corriente, pero mayor

si se emplea agua destilada. La adición posterior de magnesio, solamente influye en aumentar la producción de micelio.

En todo esto parece derivarse un cierto efecto inhibidor de la oxina, cuestión que es objeto de otro trabajo.

8. *Influencia del "corn steep" y sus cenizas en el medio de fermentación.*

Sustancia comúnmente empleada en medios de fermentación, como es el "corn steep" interesa probarla en la producción de ácido cítrico, como fuente de nitrógeno para el *Aspergillus niger.*

Para esto se prepara una solución de un "corn steep" atomizado (Roquette), que se añade en diferentes cantidades al medio de fermentación.

Para ver si la acción del "corn steep" se debe a su contenido en iones metálicos se preparan cenizas del mismo y se adicionan en cantidades que corresponden a las cantidades de "corn steep" añadido anteriormente.

Con los resultados obtenidos se construyen las gráficas núms. 7 y 8.

La adición de "corn steep" al medio sintético de producción de ácido cítrico, favorece la producción de micelio y de ácido cítrico, hasta una concentración de 0,005 %, pues después de esta cantidad los resultados tienden a disminuir. En la utilización de azúcar no se observa influencia apreciable.

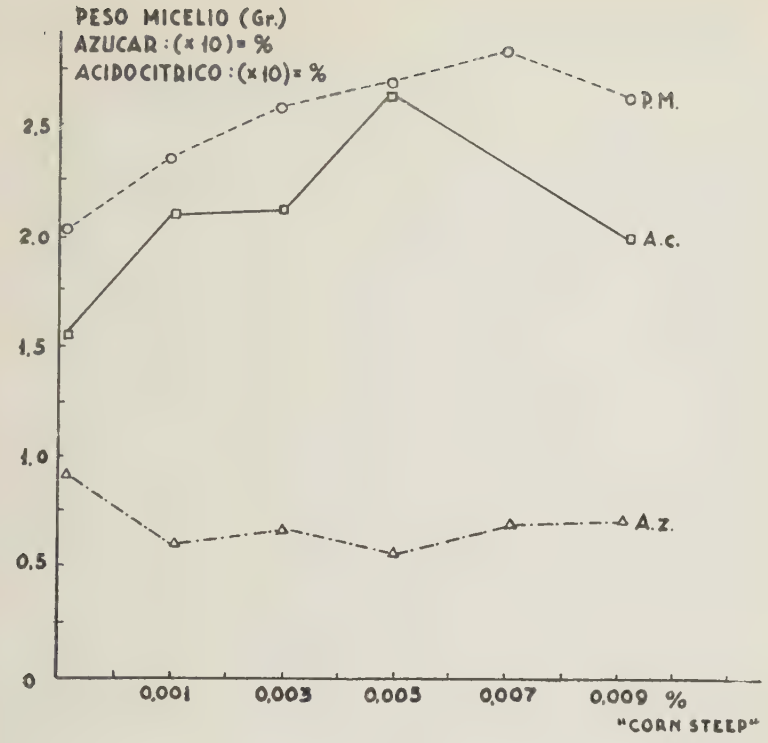
Esta acción no se debe a los iones metálicos del "corn steep", pues en la experiencia realizada con cenizas del mismo no se observan variaciones apreciables.

9. *Influencia del extracto de levadura y sus cenizas en el medio de fermentación.*

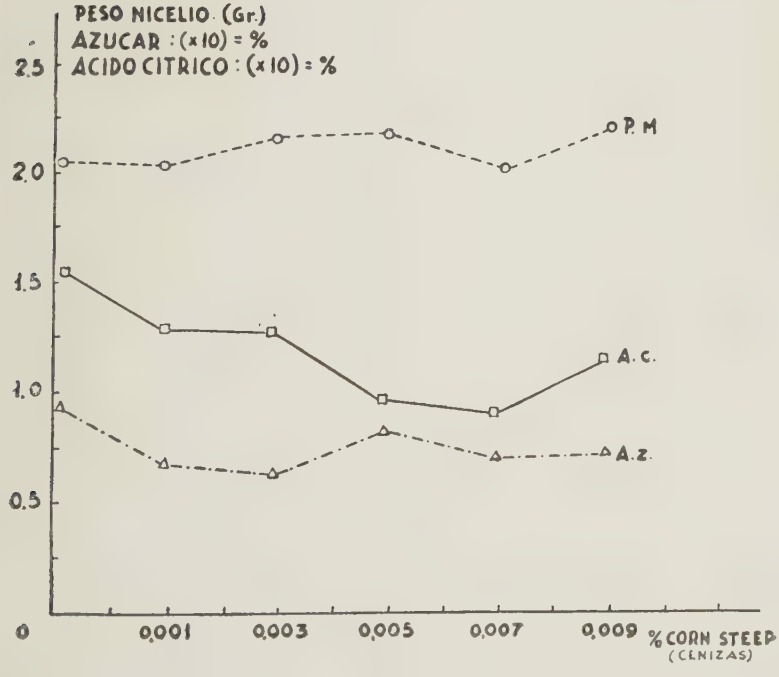
Por las mismas razones y de la misma forma que hemos utilizado el "corn steep", se hacen experiencias con extracto de levadura (Difco), para observar su posible influencia en la producción de ácido cítrico.

Las pruebas son con extracto de levadura y con sus cenizas, y los resultados se dan en las gráficas núms. 9 y 10.

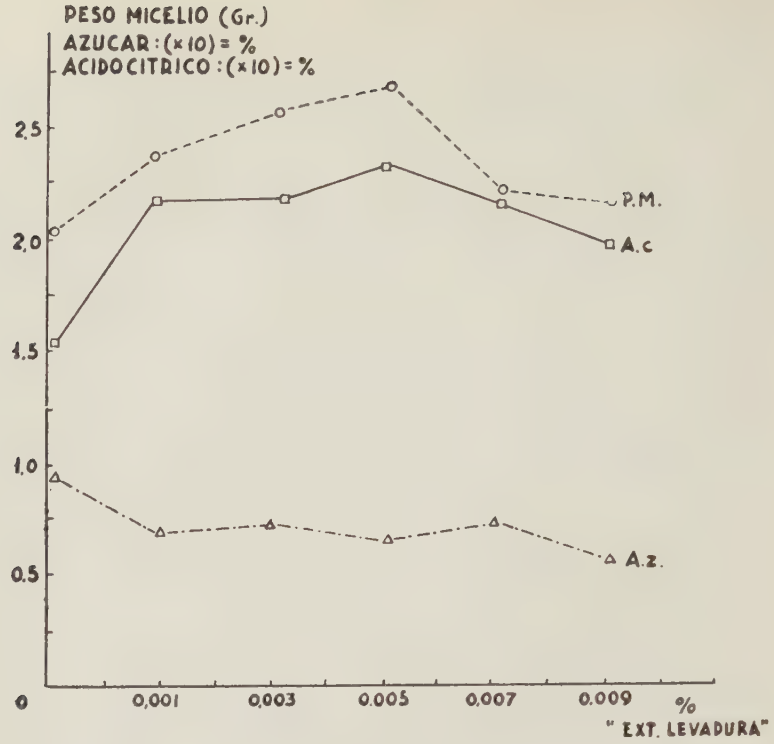
La adición de extracto de levadura al medio de producción de ácido cítrico, aumenta la producción de micelio y la formación de ácido cítrico,



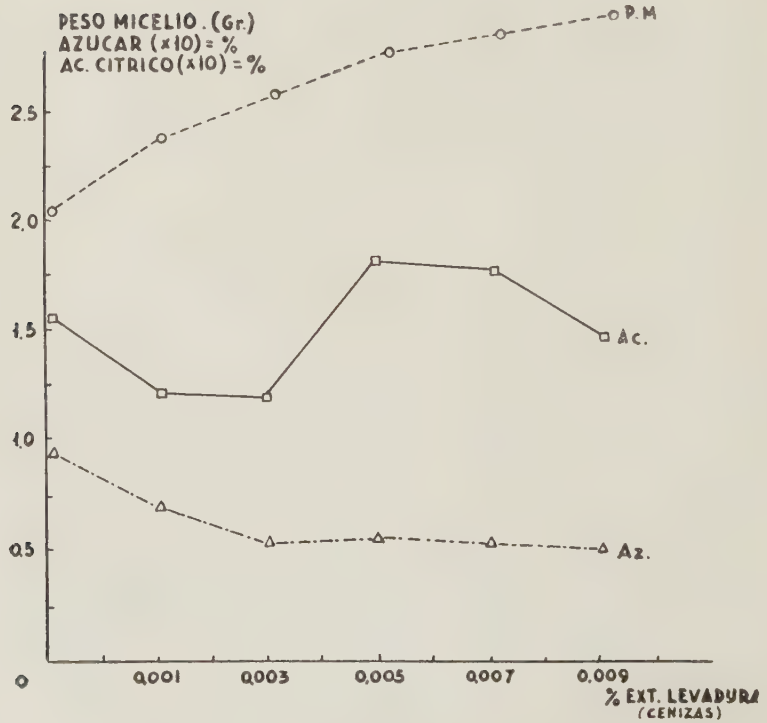
Gráfica 7.



Gráfica 8.



Gráfica 9.



Gráfica 10.

hasta una concentración de 0,005 %; a su vez la utilización de azúcar tiende a aumentar aunque de una manera poco apreciable.

A su vez la adición de cenizas de extracto de levadura, tiende también a aumentar la producción de micelio, teniendo influencia sobre la producción de ácido cítrico en las concentraciones entre 0,005 y 0,007 %. En la utilización del azúcar pasa igual que en la anterior experienia, tiende a aumentar, pero de forma poco apreciable.

DISCUSION

Antes de entrar en el estudio de los factores o variables que pueden influir en la producción de ácido cítrico por fermentación superficial, se debe de elegir una raza de *Aspergillus niger* estable y productora; nosotros partimos de un mutante: (13), obtenido por selección natural y el medio basal indicado anteriormente.

Antes de ver la influencia de los iones metálicos en la fermentación, conviene determinar éstos en los medios que se utilizan, y encontramos que solamente los existentes en el agua corriente o en la sacarosa pueden ejercer alguna acción.

En trabajos sobre fermentación cítrica, se presta escasa atención al tipo de agua utilizada, y precisamente por la presencia o ausencia de iones metálicos, el tipo de agua tiene bastante importancia. Nosotros estudiamos esto, así como la influencia de la adición de iones metálicos a aguas corriente y destilada.

Medios preparados con agua destilada, crece antes el hongo y también esporula primero; pero con agua corriente, al final, se produce más micelio y ácido cítrico y se utiliza más azúcar. La única excepción es cuando al agua destilada se añade zinc, lo cual está en contradicción con lo encontrado por Chesters & Rolinson (1951); en cambio, corrobora lo encontrado por Tomilson & Campbell & Trussell (1951).

De acuerdo con Bertrand & Wolf (1956), encontramos que el cobre aumenta el crecimiento y la esporulación; en cambio, vemos que disminuye la producción de ácido cítrico.

En resumen, la fermentación cítrica en medio con agua corriente va mejor que con agua destilada; luego cabe preguntar si en este tipo de agua existen factores que favorecen la producción de ácido cítrico. Como

estamos estudiando la influencia de los iones metálicos, interesa saber si la naturaleza de dichos factores es ésta. Para esto preparamos un extracto de agua corriente y lo añadimos en diferentes cantidades a un medio basal con agua destilada, encontrando que dichos factores no afectan a la producción de micelio, aunque sí a la utilización de azúcar y formación de ácido cítrico.

En relación con experiencias anteriores, tratamos ahora de ver la posible influencia de cada ion metálico (zinc, cobre, hierro y manganeso) en la fermentación cítrica en medio basal con agua destilada. Vemos que de los cuatro metales únicamente el zinc afecta a los factores estudiados: aumento producción de micelio, aumento utilización de azúcar, aumento formación de ácido cítrico, en proporción a la cantidad añadida.

En los análisis que hemos realizado de agua corriente y sacarosa, se observa que éstos contienen iones metálicos, aunque no en gran cantidad, pero de todas maneras, para conocer el efecto de éstos, se hace necesario eliminarlos de los medios de fermentación. Para esto recurrimos a la técnica de tratamiento por la 8-hidroxiquinolina (oxina).

Observamos que tanto el tratamiento del medio basal como de la sacarosa, da lugar a una disminución grande en la producción de ácido cítrico, en la formación de micelio y en la utilización de azúcar; esto se corrige aunque muy ligeramente por la adición de los iones metálicos.

De los resultados obtenidos parece derivarse que la oxina pudiera tener un efecto inhibidor del desarrollo y metabolismo del *Aspergillus niger;* esto la había visto Block (1955), y nosotros (1958) tratamos de demostrarlo, encontrando que la oxina en ausencia de metales inhibe al hongo a partir de una concentración de 10^{-4} M. Cuando existen iones metálicos dicha concentración es a partir de 10^{-6} M. Cuando se trata por oxina, agua de la fuente, encontramos que ésta produce inhibición completa de crecimiento y producción de ácido cítrico, lo cual corrobora que en el agua de tratamiento queda alguna actividad antifúngica.

Para tratar de aumentar los rendimientos que se obtienen en nuestras fermentaciones, añadimos algunas sustancias corrientes en medios de fermentación, probamos el "corn steep" y el extracto de levadura, tratando de ver si su posible efecto se debe a los iones metálicos que contienen.

Probadas dichas sustancias a diferentes concentraciones, se encuentra

que ambas favorecen la producción de micelio y de ácido cítrico a una concentración óptima de 0,005 %.

Probadas las cenizas de ambas sustancias, también en diferentes concentraciones, se encuentra que las de "corn steep" no poseen efecto apreciable; en cambio las de extracto de levadura dan lugar a un ligero aumento de micelio y de ácido cítrico y a un mayor consumo de azúcar. Esto parece indicar que en estas cenizas hay un factor no presente en las de "corn steep", que produce mejoramiento de la fermentación.

RESUMEN

En este trabajo se estudia la influencia de los iones metálicos (zinc, cobre, hierro, manganeso) en la producción de ácido cítrico en un medio sintético, por fermentación en superficie y por una raza de *Aspergillus niger* obtenida por selección natural en este laboratorio.

Viendo las diferencias de fermentación en medio basal preparado con agua corriente o destilada en presencia o ausencia de iones metálicos, se observa que aunque en la segunda el crecimiento y esporulación es más rápido, la producción de micelio final, ácido cítrico y utilización de azúcar es menor. Excepto en la producción de micelio, los demás resultados se deben a las impurezas contenidas en el agua corriente.

De los cuatro metales estudiados, solamente el zinc da lugar a una mayor producción de micelio y utilización de azúcar y ácido cítrico, en medio basal con agua destilada.

El tratamiento de los diferentes medios con 8-hidroxiquinolina da lugar a una inhibición del crecimiento y metabolismo del hongo.

Las cenizas de extracto de levadura contienen un factor que favorece la fermentación y que no se encuentra en las de "corn steep".

SUMMARY

In this paper we study the influence of metallic ions (zinc, copper, iron, manganese,) on the production of citric acid in a synthetic medium by surface fermentation and by a breed of *Aspergillus niger* obtained by natural selection in this laboratory.

At the sight of the differences in fermentation in basal medium prepared with common or distilled water in presence or absence of metallic ions, one can observe that although in the latter growth and sporulation are greater, the production of final mycelium, citric acid and sugar utilization are smaller. Excepting the production of mycelium, the other results are due to impurities in common water.

Of the four minerals studied, only zinc gives rise to a higher yield of mycelium and sugar utilization and citric acid, in basal medium with distilled water.

The treatment of the different mediums with 8-hydroxichinoline brings forth an inhibition in the growth and metabolism of the fungus.

The ashes of yeast extract contain a factor which favours the fermentation and which is not found in those of "corn steep".

BIBLIOGRAFIA.

M. D. Bertrand & A. Wolf. 1956. Bull. Soc. Chim. Biol. 38. 959.
S. S. Block. 1955. J. Agr. Food. Chem. 3. 229.
C. G. C. Chesters & G. N. Rolinson. 1951. J. Gen. Microbiol. 5. 553.
C. Donald & B. I. Passey & R. J. Swaby. 1952. J. Gen. Microbiol. 7. 211.
E. O. Karow & S. A. Waksman. 1947. Ind. Eng. Chem. 39. 821.
J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1957. Microbiol. Española. 10. 425.
J. L. Malo Echevarría & B. Regueiro Varela. 1958. IV Reunión Ciencias Fisiológicas. Granada.
D. Perlman & W. W. Dorrell & M. J. Johnson. 1946. Arch. Biochem. 10. 131.
D. Perlman & H. A. Lardy & M. J. Johnson. 1944. Ind. Eng. Chem. 16. 515.
Shaffer & Somogyi. 1942. Polarimetry, Saccharimetry of Sugars, pág. 196.
Snell & Snell. 1954. Colorimetric Methods of Analysis. Vol. II, págs. 400, 279, 78, 378.
N. Tomlinson & J. J. R. Campbell & P. C. Trussell. 1950. J. Bacteriol. 59. 217.
N. Tomlinson & J. J. R. Campbell & P. C. Trussell. 1951. J. Bacteriol. 61. 17.
J. M. Xandri & L. Hidalgo. 1954. X Congreso Internacional Industrias Agrícolas. Vol. II, pág. 1.512.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

Acta de la Sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 28 de noviembre de 1958.

Se abre la Sesión a las veinte horas, en el Salón de Actos del Instituto "Ramón y Cajal" del C. S. I. C., Velázquez, 138. Preside don Gerardo Clavero del Campo y actúa como Secretario D. Genaro Alas.

Se aprueba el acta de la Sesión anterior. Se admiten como socios de número a la Srta. Sagrario Mochales del Val, Licenciada en Ciencias Naturales, de Madrid, presentada por D. Justo Martínez Mata y don Francisco Maldonado; D. David Vázquez Martínez, Químico y Farmacéutico, y D. Baldomero Iñigo Leal, Farmacéutico, ambos de Madrid, y don Vicente Sanchis-Bayarri, Catedrático de la Facultad de Medicina de Valencia, presentados por D. Lorenzo Vilas y D. Miguel Rubio.

La Srta. González da cuenta, en nombre del Sr. Rubio y en el suyo propio, del trabajo "Formas "L" en *Clostridium tetani*". Seguidamente, el Sr. Rubio expone su trabajo "Un virus del "Ring-spot" en Petunia". La Srta. Gil hace una pregunta acerca del virus, que contesta el señor Rubio.

El Sr. Presidente expone un resumen de las actividades de los representantes españoles en el VII Congreso Internacional de Microbiología, celebrado en el pasado mes de agosto en Estocolmo, destacando que todas las comunicaciones españolas presentadas proceden de investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, quienes, en su mayoría, pertenecían al Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y a la Sociedad de Microbiólogos Españoles. A continuación, el señor Vicente dice que es muy probable, según noticias de la Asociación Internacional, que en el próximo Congreso de Microbiología pueda utilizarse el español en las discusiones.

Se levanta la Sesión a las veinte horas y cuarenta y cinco minutos.

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES. - Jerónima Llorente, 15. - MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los "Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal". Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI".—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de "Aula Dei", Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. I, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES".—Publicación del Instituto "Antonio J. de Cavanilles".

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto "José Celestino Mutis".

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis".

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA